



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CANALES
DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE
EN CÁNCER CERVICOUTERINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

EVERARDO HERNÁNDEZ PLATA



Tutor: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

México, D. F. a 10 de diciembre 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CANALES DE SODIO
DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN CÁNCER CERVICOUTERINO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, en el laboratorio BL-203 del Departamento de Biofísica, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Alejandro Manual García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se reconoce el apoyo brindado por la Dra. Norma Alicia Bobadilla Sandoval, del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, quien asesoró y brindó el apoyo para el uso del equipo de PCR en Tiempo Real.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Dulce María del Carmen Delgadillo Álvarez, en los experimentos de PCR estándar y clonación de fragmentos amplificados, de esta tesis.

Se reconoce la colaboración del Dr. Jaime Berumen Campos, del Hospital General de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo las extracciones de RNA de biopsias de cáncer cervicouterino, y cervix no canceroso.

Se reconoce la asesoría y el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se realizaron las secuenciaciones de los fragmentos amplificados.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el CONACYT (J50250-Q) y el PAPPIT (IN206008) de la DGAPA, UNAM.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT; asimismo, durante el primer mes de escritura de la presente tesis recibí otra beca de la misma institución mediante el donativo del Dr. Gómora (J50250-Q); y durante los últimos tres meses de la misma recibí una beca del Programa de Fomento a la Graduación de los Alumnos de Posgrado de la UNAM.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 10 de diciembre de 2008.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Laura Escobar Pérez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
INTRODUCCIÓN.....	7
Canales iónicos dependientes de voltaje	7
Clasificación de los canales de sodio dependientes de voltaje	9
Canales iónicos y cáncer.....	10
Canales de potasio.....	11
Canales de calcio	13
Canales de cloruro	13
Canales de sodio.....	14
Expresión diferencial de canales de sodio en cáncer.....	15
Canales iónicos en cáncer cervicouterino	16
OBJETIVOS	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Particulares.....	19
HIPÓTESIS	19
MÉTODOS	20
Extracción de RNA de muestras biológicas.....	20
RT-PCR estándar o de punto final.....	23
RT-PCR en Tiempo Real.....	26
Rangos dinámicos	29
Evaluación de la eficiencia de la reacción de PCR	31
Determinación de la abundancia relativa del mensajero de cada gen	32
RESULTADOS	34
Expresión de subunidades de canales de sodio en CaCu	34

Abundancia relativa de subunidades de canales de sodio en CaCu	41
DISCUSIÓN.....	55
Expresión de subunidades α de canales de sodio sensibles a la TTX en el CaCu	55
Presencia de subunidades β de canales de sodio en el CaCu.....	56
Posible función de las subunidades β de canales de sodio en el CaCu.....	57
Expresión diferencial de las subunidades de canales de sodio en el CaCu.....	59
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	61
APENDICE A.....	62
PCR estándar y PCR en Tiempo Real	62
Químicas de la PCR en Tiempo Real	64
Sondas TaqMan	64
Cuantificación de resultados.....	66
Método comparativo de C_T	66
APENDICE B.....	68
Información de pacientes cuyas biopsias fueron estudiadas en el presente estudio.....	68
Para PCR estándar	68
Para PCR en Tiempo Real	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) constituye el tercer cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial, y en México se calcula que cada dos horas muere una mujer a consecuencia de este cáncer. En los últimos años se han realizado avances significativos en la etiopatogenia del CaCu incluyendo el uso de una vacuna, sin embargo, la ausencia de marcadores tumorales que ayuden a la detección, diagnóstico y posible tratamiento del CaCu, es un área que aún no se ha investigado lo suficiente.

Recientemente, mediante experimentos electrofisiológicos y de biología molecular, nuestro laboratorio demostró la presencia de corrientes de sodio activadas por voltaje y sensibles a la tetrodotoxina (TTX) en las células de CaCu, lo cual se correlacionó con la detección de la expresión de varias subunidades alfa que codifican para canales de sodio dependientes de voltaje (canales Nav): Nav1.2, Nav1.4, Nav1.6, y Nav1.7. Aún más importante, en biopsias control (tejido cervical no canceroso) la expresión de canales de sodio se limitó únicamente a la subunidad Nav1.4, sugiriendo una expresión diferencial de los canales Navs entre tejido sano y canceroso.

Con base en tales observaciones, el objetivo general del presente trabajo consistió en determinar cuantitativamente la expresión génica de las subunidades alfa y beta que conforman los canales Nav sensibles a la TTX en el CaCu y en el tejido no canceroso y así poder establecer si existe una expresión diferencial entre ambos tejidos.

Mediante PCR estándar se detectó la expresión de Nav1.1 y Nav1.3; así como de las cuatro subunidades beta descritas a la fecha para los canales Nav (Beta1 a Beta4) tanto en cultivos primarios como en biopsias de CaCu; por el contrario, en muestras de cervix uterino no canceroso sólo se detectó la expresión de la subunidad Beta3 y solo en una de las muestras estudiadas.

En la segunda fase del presente trabajo, los experimentos de PCR en Tiempo Real revelaron que todos los genes estudiados presentan una mayor expresión en el CaCu con respecto al cérvix no canceroso, pero de manera sobresaliente, la subunidades Nav1.6 y Nav1.7b son expresadas más abundantemente, por un factor de 200 y 100 veces, respectivamente, en comparación con el resto de las subunidades analizadas. Estos resultados son de gran relevancia para el conocimiento de la biología del CaCu, y sugieren además que las subunidades Nav1.6 y Nav1.7b podrían significar nuevos

marcadores moleculares en el diagnostico y posibles terapias para el tratamiento de este carcinoma.

ANTECEDENTES

El cáncer es una enfermedad potencialmente fatal causada por factores genéticos y ambientales, en la que se observa la modificación de proteínas reguladoras que son cruciales para el funcionamiento celular y la división normal de las células. El comportamiento celular alterado conduce a la formación de aglomerados celulares malignos que destruyen el tejido normal circundante y pueden diseminarse a órganos vitales, lo cual comúnmente presagia la muerte inminente del paciente.

Entre los diferentes tipos que existen, el cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud muy importante. A nivel mundial, es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres (Mahdavi & Monk, 2005), y en México, se calcula que cada dos horas muere una mujer a consecuencia del CaCu. No obstante, el CaCu es un cáncer 100% curable si se diagnostica a tiempo. La citología cervicovaginal (Papanicolaou), la colposcopia, la histopatología y las pruebas moleculares para detectar el ácido desoxirribonucleico (DNA) del virus papiloma humano (HPV) son los métodos más empleados en el diagnóstico de esta patología (Dzul-Rosado et al., 2004; Salais et al., 2004). Recientemente se aprobó el uso comercial de una vacuna contra el CaCu (dirigida principalmente contra los HPV 16 y 18, que juntos son los responsables de poco más del 70% de los carcinomas cervicales) (Roden & Wu, 2006). El 99% de los cánceres cervicales presentan los genes de HPV de alto riesgo, es decir, los tipos 16, 18, 31 ó 45. Los papilomavirus no son clasificados por serotipo, sino por genotipo, y hasta el momento se han identificado aproximadamente 130 tipos de HPV mediante la secuenciación del gen que codifica para la proteína mayor de la cápside (L1) (de Villiers et al., 2004). Sin embargo, la infección por HPV es necesaria pero no suficiente para la aparición del CaCu, lo que sugiere la existencia de otros factores para la progresión de este cáncer (Roden & Wu, 2006).

Existen cuatro etapas en el desarrollo del CaCu: 1) infección del epitelio metaplásico en la zona de transformación cervical, por transmisión del HPV, 2) persistencia viral, 3) progresión del epitelio infectado persistentemente hacia un estado precanceroso, y 4) invasión a través de la membrana basal del epitelio (Schiffman et al., 2007).

Las infecciones producidas por HPV son transmitidas principalmente por contacto piel con piel o mucosa con mucosa, y son comunes en mujeres jóvenes durante la primera década de su vida sexual activa. La principal causa de infección es el contacto sexual. Existen evidencias que sugieren la transmisión de varios tipos de virus en un mismo evento

(Burchell et al., 2006; Herrero et al., 2005; Mendez et al., 2005; Plummer et al., 2007). El riesgo de desarrollar CaCu para una mujer portadora de múltiples tipos de HPV es mayor comparado con el de una mujer infectada con un solo tipo viral (Schiffman et al., 2007). Muchas de las infecciones de HPV son erradicadas o atenuadas por el sistema inmune dentro de 1-2 años posteriores a su generación (Stanley et al., 2007). Con una persistencia de HPV más larga, la probabilidad de erradicación inmune disminuye y el riesgo de un diagnóstico precanceroso aumenta (Plummer et al., 2007). Sin embargo, solo una minoría de las infecciones por virus de alto riesgo produce lesiones intraepiteliales escamosas, también conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y una pequeña fracción de NICs conduce al CaCu (Roden & Wu, 2006).

Independientemente del tipo de virus, las partículas de infección viral alcanzan las células germinales en la lámina basal del epitelio, presumiblemente mediante lesiones de la mucosa (Fig. 1), y se alojan de manera preferente en la zona de transformación cervical. Esta zona se caracteriza por presentar una alta proliferación celular y constituir la región en la que el epitelio escamoso estratificado del ectocervix reemplaza progresivamente al epitelio granular del endocervix (Schiffman et al., 2007).

La infección y crecimiento viral son completamente dependientes de la diferenciación de los queratinocitos (Fig. 1). Los virus infectan queratinocitos de la capa basal, pero la expresión de proteínas virales a gran escala, así como el ensamblaje viral, ocurre en las capas superficiales del epitelio escamoso (Doorbar, 2006). La expresión de los genes virales se encuentra confinada exclusivamente a los queratinocitos (Stanley et al., 2007). La integración del genoma del HPV en el genoma del huésped está asociada con el cáncer invasivo; sin embargo, dicha integración no es estrictamente necesaria para causar invasión, dado que no todas las mujeres con cáncer invasivo presentan una integración en niveles detectables (Arias-Pulido et al., 2006; Pirami et al., 1997). Pero importantemente, la actividad transcripcional continua de los oncogenes de HPV es necesaria para mantener el cáncer (Wentzensen et al., 2004).

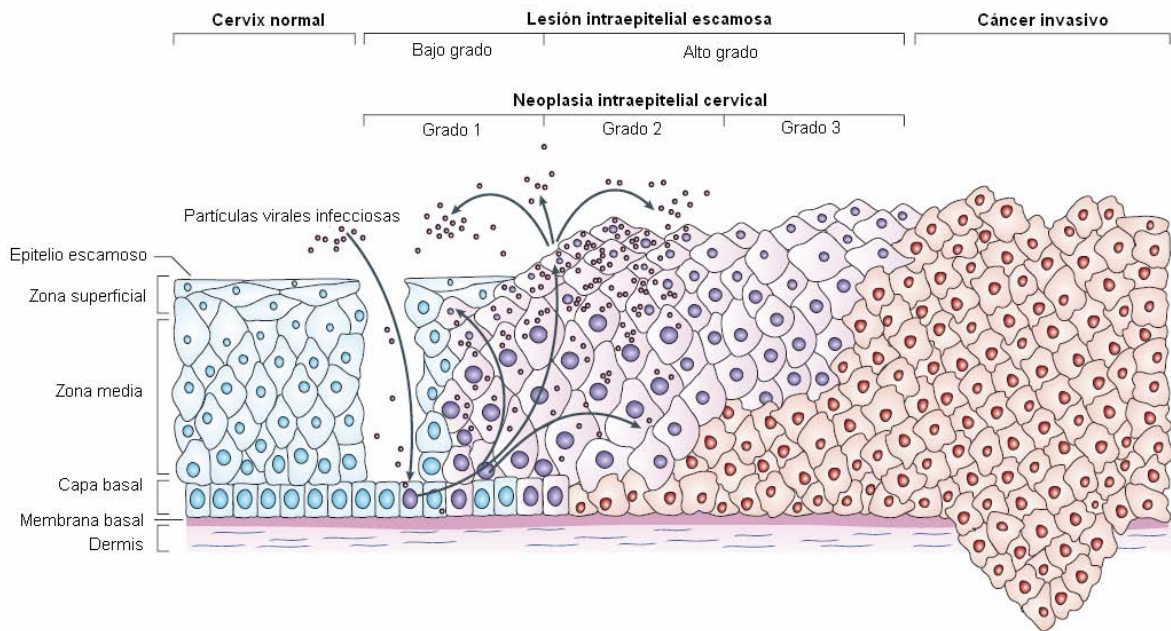


Fig. 1. Progresión del cáncer cervicouterino mediada por HPV. Las células basales del epitelio escamoso del cervix se encuentran fijas en la membrana basal, la cual es soportada por la dermis. Se ha propuesto que el virus del papiloma humano (HPV) accede a las células basales a través de micro lesiones en el epitelio cervical. Después de la infección el DNA viral es replicado. En los estratos celulares superiores (zona media y zona superficial) la replicación viral continúa, se producen las proteínas formadoras de la cápside, y el genoma viral es empaquetado para formar la progenie de viriones en el núcleo. Los virus producidos pueden iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado permiten la replicación viral. Un número reducido de infecciones por HPVs de alto riesgo progresan a neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de alto grado. La progresión de lesiones no tratadas a cáncer invasivo se encuentra asociada con la integración del genoma del HPV en los cromosomas del huésped (núcleos rojos). (Modificada de Woodman et al., 2007).

En los últimos años, la etiopatogenia de esta enfermedad ha podido ser investigada con mejores herramientas gracias a los avances en biología molecular, celular e inmunología. Ello ha permitido conocer el papel del HPV en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino y ha tenido importantes implicaciones en la metodología de identificación, diagnóstico y tratamiento del CaCu (Hines et al., 1996). No obstante, la ausencia de marcadores tumorales que ayuden a la detección, diagnóstico y posible tratamiento del CaCu, así como de los otros tipos de cáncer, es un área que demanda una mayor cantidad de estudios.

Es bien sabido que durante el desarrollo del cáncer suceden cambios en la fisiología de las células debidos a la división celular descontrolada. Para los fines del presente proyecto de investigación, nos ocuparemos de los cambios sustanciales que se presentan en la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v).

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el transporte de iones a favor de su gradiente electroquímico, lo que establece una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular, lo cual se denomina potencial de membrana (V_m). Los canales iónicos se expresan en un amplio rango de tejidos donde tienen una participación determinante en funciones celulares como la proliferación, control de volumen, actividad enzimática, secreción, invasión, expresión génica, acople excitación-contracción, comunicación intercelular, etc. (Hille, 2001; le Guennec et al., 2007). En consecuencia, defectos en el funcionamiento de los canales iónicos, ya sea por razones genéticas o epigenéticas, son frecuentemente la causa de muchas enfermedades (Diss et al., 2004; Jurkat-Rott & Lehmann-Horn, 2001; Viswanathan & Balsler, 2004). En particular, la superfamilia de canales dependientes de voltaje (es decir, aquellos que se activan por cambios en el potencial de membrana) que comprende los canales de potasio (K^+), de sodio (Na^+), de calcio (Ca^{2+}) y de cloro (Cl^-) se han relacionado con varios aspectos de la biología del cáncer (Diss et al., 2004; Olsen et al., 2003; Suzuki & Takimoto, 2004; Toyota et al., 1999).

En el caso concreto del CaCu se ha descrito que la inhibición de los canales de K^+ disminuye la tasa de proliferación de varias líneas celulares derivadas de CaCu (Suzuki & Takimoto, 2004), además de que este tipo de canales son modulados durante el ciclo celular (Crociani et al., 2003; Pardo et al., 1998), y concretamente, se ha propuesto a los canales de potasio tipo *ether á-go-go* (EAG) como marcadores moleculares para la detección y terapia del CaCu (Farias et al., 2004). Más recientemente, nuestro laboratorio reportó la presencia de una corriente de sodio sensible a la tetrodotoxina (TTX) como el principal componente de la corriente entrante en las células de CaCu, lo cual se correlacionó con la detección de varias subunidades α que codifican para canales de sodio sensibles a la TTX: $Na_v1.2$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$, y $Na_v1.7$. Aún más relevantemente, se observó que en las biopsias control (tejido cervical no canceroso) la expresión de canales de sodio se limita únicamente a la subunidad $Na_v1.4$. Con base en este antecedente directo, el objetivo del presente proyecto de investigación es determinar si existe una expresión diferencial de las subunidades α de canales de sodio entre el CaCu y el tejido de cervix no canceroso. Aunado a ello, y debido a que la actividad de la subunidad α de los canales de sodio es regulada por subunidades β , que junto con la primera forman el canal completo; también se investigarán los niveles de expresión de estas subunidades. A la fecha se conocen cuatro genes que codifican para subunidades β de canales de sodio: $\beta1$ a $\beta4$ (Goldin, 2001; Yu & Catterall, 2003).

Para una mejor comprensión del tema, en la siguiente sección se revisan algunas generalidades de la composición y diversidad de los canales de sodio dependientes de voltaje, así como su participación en la biología de otros tipos de cáncer.

INTRODUCCIÓN

Canales iónicos dependientes de voltaje

Debido a las similitudes funcionales y estructurales que comparten entre ellos mismos, los canales de sodio, potasio y calcio sensibles al voltaje forman la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Hille, 2001). La estructura proteica básica de este tipo de canales consiste de una subunidad principal denominada α (~ 260 kDa) que es codificada por un solo gen. La subunidad α forma el poro hidrofílico que permite el flujo de iones y contiene regiones especializadas que determinan la selectividad del canal y detectan los cambios en el voltaje transmembranal (sensor de voltaje). A potenciales de membrana muy negativos (-80 mV, por ejemplo), los canales de sodio se encuentran cerrados, es decir se encuentran en estado de reposo. Ante un pulso de voltaje despolarizante, los canales tienden a abrirse, como resultado del desplazamiento de los respectivos sensores de voltaje, lo cual permite que los iones fluyan a través del poro del canal. Sin embargo, este mismo proceso de apertura se acompaña de otro cambio conformacional, al cual se le denomina inactivación, mismo que provocará el cese del flujo de iones a través del canal, a pesar de que éste se encuentre en el estado abierto. La inactivación de los canales varía en el tipo de mecanismo que la origina, la proporción de canales que la presentan y la velocidad a la que sucede (cinética de inactivación), por lo que es una característica distintiva de diferentes tipos de canales.

De acuerdo con modelos de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad α de canales de sodio, estas proteínas son cadenas de aminoácidos que forman cuatro dominios homólogos, unidos entre si por asas intracelulares (Noda et al., 1986). Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales llamados S1 a S6 interconectados por asas intra y extracelulares (Fig. 2).

Algunos estudios indican que el extremo intracelular del poro está delineado por los segmentos S6, y el extracelular está revestido por las asas que unen los segmentos S5 y S6 de cada dominio (Doyle et al., 1998; Yellen et al., 1991). Tales asas, llamadas generalmente asas del poro, forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aminoácidos es un factor determinante de la conductancia, la selectividad iónica y su afinidad por diversas toxinas, mismas que modifican la actividad de la subunidad α (Catterall, 2002).

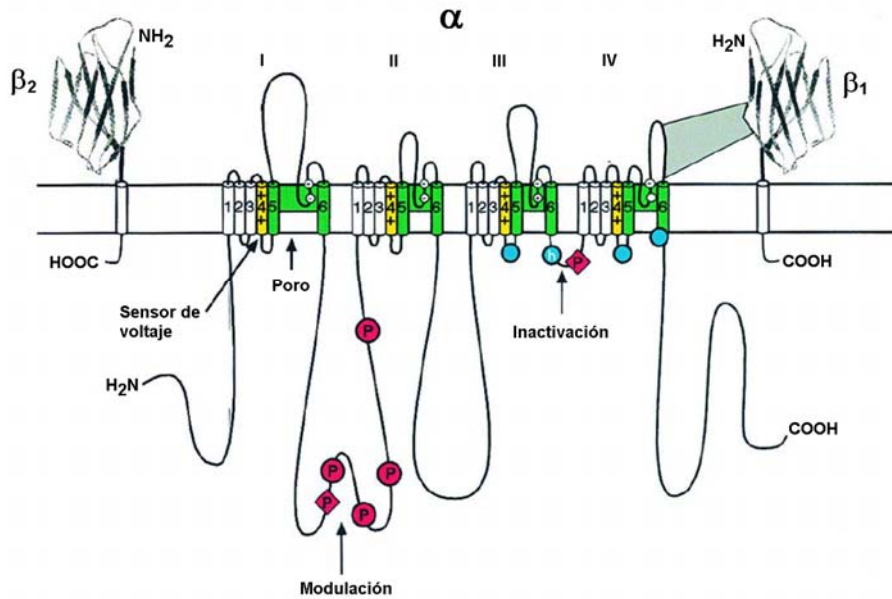


Figura 2. Representación esquemática de la estructura primaria de las subunidades α y β de los canales de sodio. En números romanos se indican cada uno de los cuatro dominios que componen la subunidad α . Se indican los diferentes sitios de fosforilación (P), así como la región responsable de la inactivación. Los signos (+) en el segmento S4 indican la región del canal denominada sensor de voltaje. H₂N y COOH indican los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. β_1 y β_2 representan a las subunidades accesorias que pueden estar asociadas a la subunidad α . Modificada de (Catterall, 2000).

En células de mamífero, la subunidad α de los canales de sodio se encuentra generalmente asociada a dos subunidades β que regulan su actividad, y que junto con la primera forman el canal completo. Las subunidades β tienen un peso molecular aproximado de 40 kDa y pueden alterar el funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje de varias maneras, incluyendo la modificación de su dependencia al voltaje, la activación y la inactivación; la amplitud de las corrientes modulando el tráfico intracelular de la subunidad α (incorporando más canales en la membrana plasmática); e incrementando su estabilidad en la superficie celular mediante su asociación con moléculas de citoesqueleto, tales como la anquirina (Diss et al., 2007).

A la fecha se conocen cuatro genes que codifican para subunidades β de canales de sodio: β_1 a β_4 (Goldin, 2001; Yu & Catterall, 2003), y al menos una de ellas (β_1) puede ser expresada en diferentes isoformas, generadas por procesamiento alternativo de su ácido ribonucleico mensajero (mRNA), y por mecanismos de retención de intrones (Qin et al., 2003). Las subunidades β tienen un solo segmento transmembranal y un extremo amino extracelular prominente semejante a las inmunoglobulinas y a la familia de moléculas de adhesión celular en general. Dicho extremo desempeña funciones relevantes e

independientes de la clásica modulación de los canales de sodio; por ejemplo, participan tanto en las interacciones homofílicas célula-célula, como en las adhesiones heterofílicas; y de manera sobresaliente en la asociación con moléculas de matriz extracelular, para inducir la repulsión celular (Catterall, 2000; Diss et al., 2007; Isom, 2001; Srinivasan et al., 1998).

Clasificación de los canales de sodio dependientes de voltaje

A diferencia de los canales de calcio, las corrientes transportadas por los canales de sodio son más homogéneas en sus propiedades biofísicas. Debido a su rápida activación e inactivación (ambos procesos transcurren en menos de 3 ms) se les ha catalogado como corrientes transitorias desde su descripción original por Hodgkin y Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952). La diferencia más sobresaliente entre los diferentes tipos de canales de sodio es su sensibilidad a la TTX y a la saxitoxina (STX), dos neurotoxinas que previenen la generación de corrientes de sodio mediante su unión específica al poro del canal, lo que resulta en el bloqueo de la conducción de iones (Lipkind & Fozzard, 1994; Narahashi, 2000; Ritchie & Rogart, 1977). No obstante, la afinidad de los canales de sodio por la TTX puede variar de un tipo celular a otro. Esta observación permitió establecer la existencia de dos grupos principales: los canales de sodio con una constante de disociación (K_D) para la TTX en el rango nanomolar (2-10 nM) se denominan “sensibles a la TTX”, mientras que aquellos en los que la K_D se ubica en el rango micromolar ($>1 \mu\text{M}$) conforman el grupo “resistente a la TTX” (Hille, 2001; Ritchie & Rogart, 1977). La correspondencia de estos grupos de canales con las subunidades α de canales de sodio conocidas al momento es la siguiente: $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ dan lugar a canales de sodio sensibles a la TTX cuando se expresan en ovocitos de rana o en células de mamífero, mientras que las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$, y $\text{Na}_v1.9$ generan corrientes insensibles a la TTX (para una revisión véase Yu & Catterall, 2003). Otra diferencia importante entre los canales de sodio sensibles y resistentes a la TTX es que los últimos se inactivan con una cinética 10-20 veces más lenta que los primeros (Roy & Narahashi, 1992). Finalmente, en la naturaleza también existen canales de sodio que no son activados por voltaje, tales como el canal de sodio epitelial (EnaC). Sin embargo, son estructuralmente diferentes a los canales activados por voltaje, por esta razón, en el presente trabajo el término “canal de sodio” se empleará para referirnos exclusivamente a los canales de sodio dependientes de voltaje.

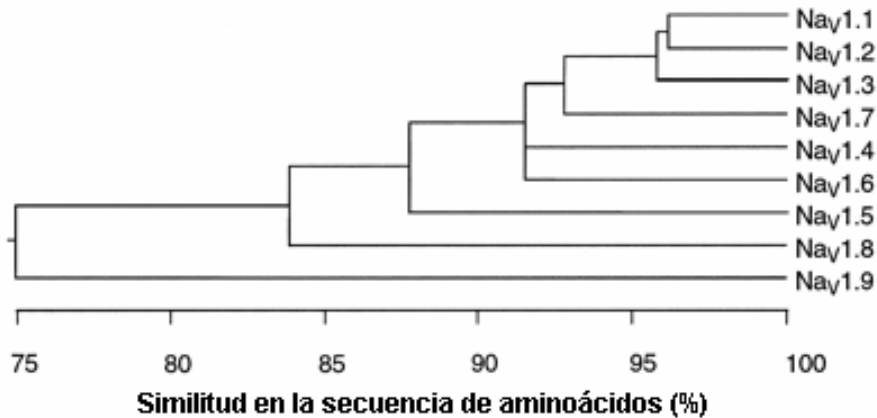


Figura 3. Árbol genealógico de los canales de sodio dependientes de voltaje. La comparación entre las subunidades α fue realizada con Megalign del programa DNASTar, utilizando el método CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988) considerando únicamente la secuencia de aminoácidos de las regiones que atraviesan la membrana y las asas citoplasmáticas que unen los dominios III y IV (Catterall et al., 2003).

Canales iónicos y cáncer

La migración celular es un proceso fisiológico importante, con una relevancia mayor en los procesos patofisiológicos como el cáncer. Dado que forma parte crucial en los eventos de la metástasis, es en gran medida responsable de la muerte por esta enfermedad. Para migrar, las células deben adquirir una asimetría espacial que les permita usar fuerzas intracelulares para llevar a cabo translocaciones en el cuerpo. Una manifestación de esta asimetría es una morfología polarizada, en donde se distinguen claramente una parte frontal y una distal de la célula (Lauffenburger & Horwitz, 1996). La parte frontal está formada por pseudópodos que dirigen el avance de la célula; y se ha sugerido que la retracción de la parte distal de la célula está relacionada con la contracción de la red de actina-miosina del citoesqueleto. Esta polarización funcional de la estructura de citoesqueleto es mediada por un gradiente de concentración de calcio, el cual es mayor en la parte distal que en los pseudópodos (Schwab, 2001).

Por otro lado, además de cumplir con su función canónica en el control de la actividad eléctrica en células eléctricamente excitables (como neuronas, músculo y células secretoras), los canales iónicos dependientes de voltaje se expresan de manera significativa en células no excitables. Las células cancerosas son un claro ejemplo de lo anterior. No obstante que la mayoría de los tipos de cáncer se originan de células eléctricamente no excitables, la participación de canales dependientes de voltaje en la biología del cáncer es crucial en varias etapas de la progresión de esta enfermedad. Este

conocimiento es el resultado de una considerable cantidad de investigaciones que se han realizado con dicho propósito en varias partes del mundo (Fraser & Pardo, 2008) y que a continuación se describirán de manera breve para cada uno de los canales iónicos dependientes de voltaje.

Canales de potasio

Algunos canales de potasio han sido involucrados en la migración de células cancerosas, entre ellos los canales $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v1.5$, $I_{K_{Ca}}$ y BK_{Ca} . Los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) juegan un papel preponderante en la migración celular; entre ellos, el canal $I_{K_{Ca}}$ (también llamado SK4) que aparentemente se encuentra involucrado en el proceso de movilización tanto en células cancerosas y no cancerosas. Este canal facilita la retracción de la parte distal de células migrantes induciendo el encogimiento celular local en este polo de la célula (Hahn & Covault, 1992). Debido al gradiente intracelular de calcio, el canal SK4 pareciera ser activo principalmente en la parte trasera de las células migrantes; sin embargo, éste y otros canales K_{Ca} también se encuentran en la parte frontal de las células en movimiento (Schwab et al., 2006), por lo que dichos canales podrían tener alguna otra función en la biología de la migración celular.

Recientemente se reportó que en las células MDA-MB-435s, una línea celular de cáncer de mama altamente metastásica, la expresión funcional de otro canal K_{Ca} , el SK3, es importante para la migración celular pero no para la proliferación. Mientras que su expresión en líneas celulares no metastásicas ha sido estudiada pero no detectada. Además, al bloquear la expresión de este canal con el uso de un RNA de interferencia (siRNA) específico, se abate prácticamente en su totalidad la migración de las células MDA-MB-435s. Además, al realizar experimentos de expresión transitoria, se pudo observar el aumento en la migración de células carentes del canal SK3. Por lo que se ha propuesto el bloqueo de este canal para impedir la migración, invasión y propiedades metastásicas de las células que lo expresen (Potier et al., 2006).

Por otro lado, la inhibición de los canales de potasio $K_v1.3$ de los linfocitos T previene la diferenciación y crecimiento celular inducido por estimulación con antígenos (Deutsch & Chen, 1993; Koo et al., 1997). Los canales de potasio de estas células influyen, indirectamente, la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) modificando el potencial de membrana. En las células no excitables la entrada de calcio puede ser mediada por canales de calcio activados por liberación de calcio intracelular (canales SOC), y por varios

miembros de la familia TRP (Clapham, 2002), por lo tanto, la hiperpolarización causada por la actividad de los canales de potasio incrementa la fuerza impulsora para la entrada de calcio desde el medio extracelular. Así, los canales de potasio están involucrados en la diferenciación y crecimiento de células no excitables mediante su influencia en la $[Ca^{2+}]_i$. Aunado a ello, varios estudios han demostrado que la actividad de los canales de potasio es un factor determinante para la progresión del ciclo celular a través de la fase G1 (Wonderlin & Strobl, 1996).

Asimismo, se ha reportado que la actividad del canal humano de potasio del tipo *ether á go-go* (hEAG) confiere propiedades oncogénicas. En tejidos normales se encuentra solamente en el cerebro, mientras que puede expresarse en células tumorales de prácticamente cualquier tejido (Pardo et al., 2005). La expresión del canal hEAG, al menos a nivel de mRNA, ha sido reportada en células de cáncer cervical, tumores de mama, neuroblastoma, melanoma y carcinoma de colon; y en experimentos en donde se inhibe su expresión se ha observado una reducción en la proliferación en líneas celulares de cáncer, por lo que se ha propuesto como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer (Pardo, 2004). Sin embargo, el bloqueo farmacológico de este canal no es factible con los compuestos disponibles hasta el momento, dado que pertenece a la familia de canales de potasio hERG que está involucrada en la repolarización cardíaca, y su inhibición puede inducir arritmias. Por ello, los estudios actuales se enfocan al uso de anticuerpos para isoformas específicas del canal, que puedan ser utilizados en la detección y tratamiento de la enfermedad (le Guennec et al., 2007).

Canales de calcio

Los canales de calcio dependientes de voltaje desempeñan un papel muy importante en la regulación de la homeostasis del calcio. El incremento en la concentración intracelular de este ión permite la activación de múltiples mecanismos involucrados con la biología del cáncer, tales como la proliferación, contracción, secreción, invasión y modificación de la expresión génica (le Guennec et al., 2007). La expresión funcional de los canales de calcio dependientes de voltaje, específicamente del canal $Ca_v3.2$ (que junto con $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ forman la familia de canales de calcio tipo T), ha sido reportada en las líneas celulares PC-3, LNCaP y DU-145 de cáncer de próstata, MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MDA-MB-361 de cáncer de mama y Jurkat de leucemia; en donde desempeñan un papel fundamental en la proliferación celular. Haverstick y colaboradores (2000), utilizaron líneas celulares de cáncer de próstata, así como una cepa modelo de ratón, para demostrar que al reducir el

flujo de calcio al interior celular, bloqueando la actividad de los canales $Ca_v3.2$ con un compuesto semi específico (TH-1177); la proliferación celular disminuye considerablemente. El incremento en la concentración de calcio es necesaria en el ciclo celular en distintas fases de transición específicas, y aún no se sabe en cuál de ellas actúa el compuesto TH-1177, pero es posible que intervenga en varias de ellas. El efecto de los canales tipo T sobre la proliferación celular ha sido confirmada más recientemente en células de cáncer de mama, en las que el abatimiento de la expresión de canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ mediante el uso de RNAs de interferencia, resultó en una disminución del 45% de la proliferación celular (Taylor et al., 2008b; Taylor et al., 2008a).

Canales de cloruro

Gruber y Pauli (1999) demostraron que la expresión del canal de cloruro activado por calcio CLCA2 es menor en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MCF-7 respecto a las células no cancerosas. Inversamente, la reintroducción estable de este canal, reduce la capacidad invasiva de las líneas celulares *in vitro*; así como la formación de tumores metastásicos de las células MDA-MB-231 en cepas modificadas de ratón; lo que llevó a pensar que los canales de cloruro activados por calcio podrían actuar como supresores de tumores en el cáncer de mama; y posteriormente, se observó que podrían desempeñar la misma función en cáncer colorrectal (Bustin et al., 2001). Sin embargo, aún no se han obtenido evidencias claras de los mecanismos celulares a través de los cuales este canal puede ejercer su función anticancerígena, y hasta la fecha no se han reportado otros estudios que relacione a los canales de cloruro con el cáncer.

Canales de sodio

En 1995 se reportó el primer análisis de canales de sodio dependientes de voltaje en células cancerosas, correspondientes a dos líneas celulares de cáncer de próstata de rata: Mat-Ly-Lu, altamente metastásica, y AT-2, ligeramente metastásica. En la línea Mat-Ly-Lu se detectó una corriente entrante generada por el transporte de sodio, por canales dependientes de voltaje sensibles a la TTX (la corriente fue inhibida en su totalidad con una concentración de 600 nM de la toxina); mientras que en la línea, AT-2, no se encontró ninguna corriente entrante. Al evaluar la importancia de esta corriente sobre la capacidad metastásica, se observó que su inhibición conlleva a una disminución de hasta el 50% en la capacidad de invasión de las células altamente metastásicas (Grimes et al., 1995). Dos años más tarde, se reportó el mismo fenómeno al estudiar las líneas PC-3 (metastásica) y

LNCaP (no invasiva) de cáncer de próstata de humano; lo cual sugería fuertemente que la expresión funcional de canales de sodio es importante para que se lleve a cabo la metástasis. Posteriormente, el mismo grupo de investigación analizó la línea DU-145 de cáncer de próstata humano, con capacidad mínima de invasión y raramente metastásica; encontrando que los canales de sodio no se expresan en dichas células (Laniado et al., 1997). Un análisis detallado con herramientas de biología molecular reveló que el canal que se sobre expresa en el cáncer de próstata es el formado por la subunidad $Na_v1.7$ (Diss et al., 2005). Por lo que, la expresión de este canal se ha propuesto como un novedoso marcador de cáncer de próstata y un nuevo blanco terapéutico (Diss et al., 2005).

Al parecer, el cáncer de próstata no es el único en el que la expresión de los canales de sodio desempeña un papel importante en la biología del carcinoma, pues en el cáncer de mama también se han visto involucrados. En este caso, mediante el bloqueo de los canales de sodio sensibles a la TTX en la línea celular MDA-MB-231, se determinó que la actividad de estos canales se encuentra estrechamente relacionada con la capacidad invasiva de estas células, ya que disminuye de manera significativa al bloquear totalmente la actividad de los canales (Roger et al., 2003).

En un estudio posterior, se pudo comprobar, que además de contribuir en el proceso invasivo, la actividad de los canales de sodio está involucrada con la migración celular, la galvanotaxis (movimiento direccional en un pequeño campo eléctrico dirigido por corriente), y la endocitosis; ya que todas estas funciones celulares se vieron notablemente disminuidas en la línea celular MDA-MB-231 en presencia de TTX. Además, en este estudio, se determinó que el canal de sodio sobre expresado, y directamente relacionado con la capacidad metastásica *in vitro*, así como con la progresión del cáncer *in vivo*, corresponde a la subunidad $Na_v1.5$, en su variante neonatal originada por el procesamiento alternativo del mRNA (Fraser et al., 2005).

En otros tipos de cáncer, como el de pulmón (estudiado en líneas celulares de células pequeñas, no pequeñas y directamente en biopsias) (Onganer & Djamgoz, 2005; Roger et al., 2007), así como en la leucemia (le Guennec et al., 2007) se ha investigado la participación de los canales de sodio en distintos aspectos de la biología celular involucrados en el cáncer y ha quedado establecido que participan en la invasividad de las células *in vitro*.

Expresión diferencial de canales de sodio en cáncer

Un aspecto sobresaliente de la participación de los canales de sodio en la biología de diferentes tipos de cáncer es la expresión diferencial de las subunidades que forman estos canales entre el tejido canceroso y el sano, así como del tipo de subunidad α mayoritariamente expresada en los diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, la línea celular derivada de cáncer de próstata MAT-LyLu posee los mRNAs de al menos ocho diferentes subunidades α de canales de sodio. De ellos, los más abundantes son $\text{Na}_v1.7$ y $\text{Na}_v1.1$. En comparación, la línea celular AT-2, con una actividad de metástasis mucho más débil que las MAT-LyLu, presenta niveles de mRNA muy bajos para las subunidades α de los canales de sodio (Diss et al., 2001). En concordancia con estas observaciones, estudios electrofisiológicos indican que las células MAT-LyLu expresan una corriente de sodio dependiente de voltaje cuyas características biofísicas y farmacológicas coinciden con las descritas para los canales de sodio formados por la subunidad $\text{Na}_v1.7$ (Ding & Djamgoz, 2004; Grimes & Djamgoz, 1998). Los trabajos del grupo de investigación encabezado por el Profesor Mustafa Djamgoz, en el Colegio Imperial de Londres, han demostrado la importancia del papel que desempeñan los canales de sodio en diversos procesos celulares fundamentales relacionados con el comportamiento metastásico de las células MAT-LyLu, por ejemplo, en la invasión (Grimes et al., 1995), motilidad (Fraser et al., 2003), desarrollo morfológico (Fraser et al., 1999), actividad secretora (Mycielska et al., 2003), así como el efecto del factor de crecimiento epidérmico sobre tales eventos celulares (Ding et al., 2008).

Por otro lado, los carcinomas de próstata y de mama comparten mucha similitud en varios aspectos que incluyen la sensibilidad a hormonas, un pronunciado tropismo por metástasis hacia los huesos y tendencia a la co-ocurrencia en familias (Rodríguez et al., 1998). Las similitudes entre estos dos tipos de cáncer se extienden al nivel molecular, pues un par de trabajos recientes han demostrado que la capacidad metastásica de líneas celulares de cáncer de mama *in vitro* y la progresión del mismo carcinoma *in vivo* está directamente relacionada con un incremento en la expresión y actividad de canales de sodio, y de manera particular de la subunidad $\text{Na}_v1.5$ (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003). Es importante mencionar que en estos estudios se compararon los niveles de las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ entre la línea celular altamente metastásica MDA-MB-231 y la MCF-7, la cual manifiesta una capacidad metastásica más débil. La diferencia en expresión total de subunidades de canales de sodio entre ambas líneas celulares fue de más de 100 veces, de la cual, la subunidad $\text{Na}_v1.5$ representó el 82% de dicha sobre expresión en las células MDA-MB-231, y el restante 18% fue debido a la subunidad

Na_v1.7, mientras que Na_v1.6 se expresó en cantidades similares en ambas líneas celulares (Fraser et al., 2005).

Los antecedentes descritos en los dos párrafos anteriores indican que además de expresarse de manera diferencial en los cánceres de próstata y de mama, parece existir una expresión preferencial tejido específica de las subunidades que dan lugar a los canales de sodio.

Canales iónicos en cáncer cervicouterino

La información en la literatura acerca de la participación de los canales iónicos en la biología del CaCu se limita a reportes sobre la existencia de canales de cloruro activados por volumen (Shen et al., 1996; Shen et al., 2000), y diferentes tipos de canales de potasio dependientes de voltaje (Farias et al., 2004; Suzuki & Takimoto, 2004). De particular relevancia para el presente trabajo de tesis, el grupo del Dr. Camacho (Farias et al., 2004) reportó la presencia de corrientes de potasio muy prominentes debidas al canal ether a-go-go (EAG) en células de cultivos primarios provenientes de biopsias de CaCu (Fig. 4). Los resultados de dicho trabajo permitieron proponer al canal EAG como un potencial marcador molecular del CaCu. Observando los registros de corriente de la Fig. 4 se puede detectar un pequeño componente de corriente entrante cuya máxima amplitud se observó a voltajes negativos (alrededor de -20 mV; Fig. 4A). Este componente de corriente entrante fue estudiado con mayor detalle posteriormente por nuestro grupo de investigación y los resultados se describen brevemente a continuación.

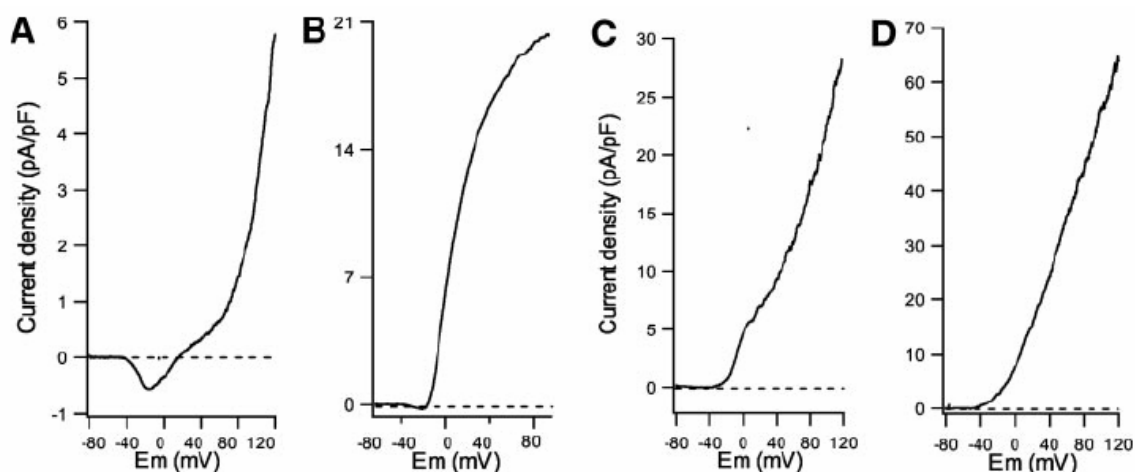


Figura 4. Relaciones corriente-voltaje obtenidas de células en cultivo primario provenientes de biopsias de cáncer cervical. Los registros se obtuvieron con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa, en respuesta a rampas de voltaje de -80 a +120 mV. Cada panel corresponde a una célula diferente. Note el componente de corriente entrante entre -40 y 0 mV registrado en la célula del panel **A** (Modificada de Farias et al., 2004).

Utilizando los mismos cultivos primarios establecidos por el grupo del Dr. Camacho (Farias et al., 2004), así como biopsias de cervix con cáncer y no canceroso, nuestros resultados indican que la aparición del CaCu se acompaña de una mayor expresión funcional de canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a la TTX (Fig. 5A y B). Concretamente, se detectó la presencia de las subunidades $Na_v1.2$, $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$, mientras que la subunidad $Na_v1.4$ se observó tanto en el tejido sano como en el canceroso (Fig. 5C) (Diaz et al., 2007). Es importante mencionar, que estudios posteriores sobre la identidad molecular de la subunidad $Na_v1.7$ detectada en CaCu, han revelado la existencia de dos posibles isoformas de dicho gen, una que corresponde a la secuencia reportada en el GenBank (X82835), y otra que comparte sólo un 87% de homología con dicha secuencia, y que no ha sido reportada previamente en humano. En adelante, tales isoformas serán llamadas $Na_v1.7a$ y $Na_v1.7b$, respectivamente¹.

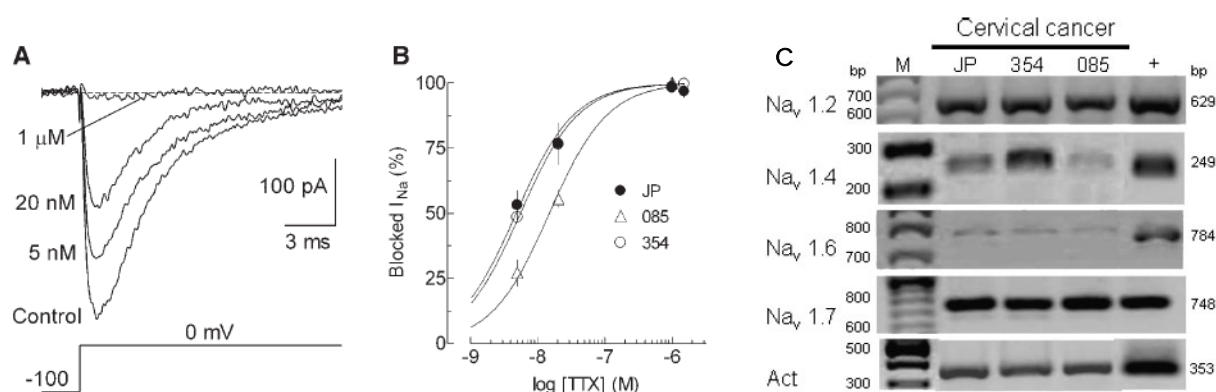


Figura 5. Canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a la TTX en CaCu. **A)** Trazos representativos de corrientes de sodio a 0 mV en la presencia de las concentraciones de TTX indicadas. **B)** Curva dosis-respuesta para el bloqueo de la corriente de sodio por TTX en células de CaCu provenientes de tres cultivos primarios diferentes (JP, 085 y 354). **C)** Expresión de diversas subunidades α de canales de sodio en los mismos cultivos primarios del panel B. Muestras de RNA total (500 ng) fueron analizadas mediante RT-PCR estándar usando *primers* específicos para cada una de las subunidades α indicadas, así como para β -actina (Act). En el carril M se corrió el marcador de peso molecular en incrementos de 100 pares de bases (bp), (Modificada de Diaz et al., 2007).

Los resultados obtenidos hasta el momento por nuestro grupo de investigación referentes a la expresión diferencial de canales de sodio en CaCu, representan una observación importante y trascendental que permite considerar a estos canales como posibles marcadores moleculares para la detección y como blanco para el tratamiento del CaCu. Con la idea de profundizar en dicha observación inicial, el objetivo del presente proyecto de investigación es realizar un estudio de expresión génica mediante PCR en tiempo real para determinar si existen diferencias cuantitativas en la expresión de las diferentes

subunidades (α y β) de canales de sodio. De ser el caso, será importante caracterizar electrofisiológica y molecularmente dicha subunidad o subunidades y así proponerla (s) como blanco principal para la detección y/o tratamiento del CaCu.

¹ Cabe acotar que la aseveración de la posible existencia de las dos isoformas tiene como respaldo (hasta el momento) los resultados obtenidos utilizando únicamente el fragmento de 748 pares de bases amplificado con la técnica de PCR. Para obtener una conclusión final al respecto, tenemos planeado clonar la secuencia completa de dicho canal, como parte de un proyecto paralelo a la presente tesis de maestría.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar cuantitativamente la expresión génica de las subunidades α y β de los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en CaCu.

Objetivos Particulares

1. Investigar la expresión de las subunidades α ($\text{Na}_v1.1$ y $\text{Na}_v1.3$) y β ($\text{Na}_v\beta1-\beta4$) en cultivos primarios y biopsias de CaCu, así como en biopsias de tejido no canceroso.
2. Determinar la abundancia relativa de las subunidades α y β de los canales de sodio dependientes de voltaje expresados en CaCu.

HIPÓTESIS

Las subunidades α y β de los canales de sodio presentes en CaCu se expresan diferencialmente entre ellas y con respecto al tejido de cervix no canceroso.

MÉTODOS

La estrategia experimental del presente trabajo consistió en tres etapas. La primera de ellas fue la obtención de RNA de las distintas muestras biológicas; la segunda fase consistió en la detección de subunidades α y β de los canales de sodio mediante la técnica de RT-PCR estándar, y en la etapa final se cuantificó la expresión relativa de cada una dichas subunidades utilizando la técnica de PCR en tiempo real con el empleo de sondas TaqMan. A continuación se detallan las técnicas utilizadas en cada una de las etapas.

Extracción de RNA de muestras biológicas

Se extrajo RNA total de cultivos de células de CaCu humano, obtenidos a partir de la descongelación de células de cultivos primarios previamente establecidos por el Dr. Javier Camacho, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. Brevemente, los cultivos primarios fueron establecidos en 2004 por miembros de laboratorio del Dr. Camacho, bajo el siguiente procedimiento: se obtuvieron biopsias de pacientes diagnosticadas con CaCu, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento anticancerígeno (quimioterapia, radioterapia, o cirugía), registradas en el Instituto Nacional de Cancerología, siguiendo las consideraciones éticas correspondientes. Se disecaron fragmentos de tejido de aproximadamente 0.25 cm³ e inmediatamente se colocaron en tubos cónicos con medio de cultivo celular preparado con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) rico en glucosa, 10% de suero fetal bovino y antibióticos, para ser transportados al laboratorio. El tejido fue sometido a fragmentación mecánica para obtener células aisladas, mismas que fueron distribuidas en cajas Petri e incubadas a 37°C en una atmósfera saturada de agua y compuesta de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Cuando la monocapa de células alcanzó una confluencia aproximada del 80%, los cultivos celulares fueron tripsinizados, y una alícuota de células fue resembrada en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió tres veces y posteriormente alícuotas de células fueron congeladas en nitrógeno líquido, para su posterior uso en diferentes tipos de experimentos.

Tres alícuotas obtenidas de esta manera fueron donadas a nuestro laboratorio, mismas que fueron descongeladas y dispersadas en botellas de poliestireno de 80 cm² (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con medio DMEM rico en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 mM de piruvato de sodio, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina, y 100 μ g/ml de estreptomycin, e incubadas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Cada 6 a 7 días los cultivos fueron renovados usando una digestión breve con tripsina y una solución salina libre de Ca²⁺ y Mg²⁺, seguida de la siembra del 10% del total

de las células. Los tres cultivos primarios fueron denominados JP, 085 y 354 y fueron caracterizados electrofisiológicamente en un reporte previo de nuestro laboratorio (Díaz et al., 2007).

Cuando los cultivos primarios llegaron a una confluencia del 80 al 90%, las células fueron extraídas de los frascos de cultivo mediante una digestión breve con tripsina, y resuspendidas en 10 ml del mismo medio de cultivo; se preparó una dilución 1:10 con el medio de cultivo y posteriormente una dilución 1:2 con el colorante azul de tripano, para ser cuantificadas en cámaras de Neubauer. Se colectaron $\sim 5 \times 10^6$ células por centrifugación y se procesaron con el kit NucleoSpin® RNA II (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) para obtener RNA total. El procedimiento general que se siguió con este kit se ilustra en la Fig. 6. El proceso inició con la lisis celular mediante una incubación con un amortiguador que contenía elevadas cantidades de sales caotrópicas, que inactivaron inmediatamente a las RNasas presentes en la muestra, y crearon las condiciones adecuadas para la adsorción del RNA a la membrana de sílica presente en las columnas del kit. Después de la lisis, se consiguió la homogenización y reducción de la viscosidad por medio de la filtración de la muestra en la misma columna. La membrana de sílica fue lavada con un amortiguador de desalado (MDB, *membrane desalting buffer*) que permitió la generación de las condiciones óptimas para un tratamiento posterior con DNasa I, que eliminó cualquier molécula de DNA contaminante unida a la membrana. Posteriormente la columna fue lavada, y la muestra colectada en un volumen final de 100 μ L de agua libre de RNasas.

En colaboración con el Dr. Jaime Berúmen, del Hospital General de México, se obtuvo RNA total de biopsias de pacientes con cáncer cervical en distintos estadios de invasividad (de acuerdo al sistema de clasificación FIGO (Quinn et al., 2006)), diagnosticados en la Unidad de Oncología del mismo Hospital. Solamente se incluyeron muestras de pacientes que no habían recibido ninguna terapia anticancerígena, ni tratamiento quirúrgico alguno. Asimismo, se obtuvo RNA total de biopsias de cérvix no canceroso, provenientes de histerectomías por patologías ginecológicas benignas realizadas a pacientes cuya evaluación de presencia de cáncer, por colposcopia, fue negativa. En ambos casos, la extracción del RNA se realizó con el reactivo de triazol (Invitrogen, Carlsbad, CA).

En todos los casos, la concentración de las muestras de RNA fue determinada con la ayuda de un espectrofotómetro (Eppendorf AG, Alemania), y su integridad fue evaluada

por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Fig. 7). Todas las muestras fueron almacenadas a -70°C para su uso posterior.

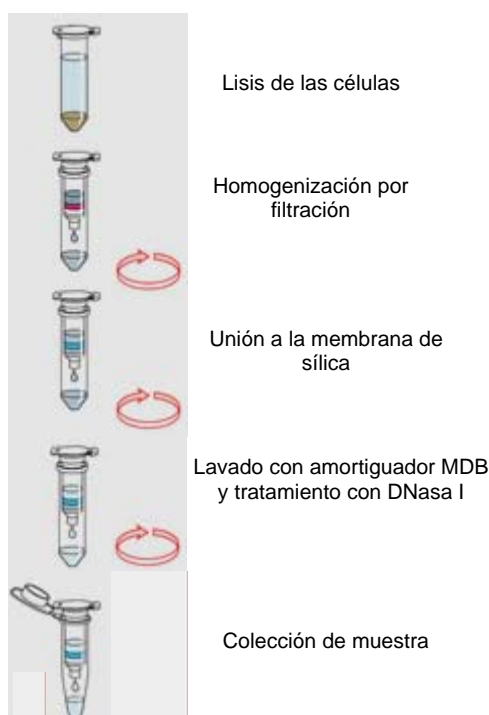


Figura 6. Procedimiento general para extracción de RNA total mediante el kit NucleoSpin® RNA II.

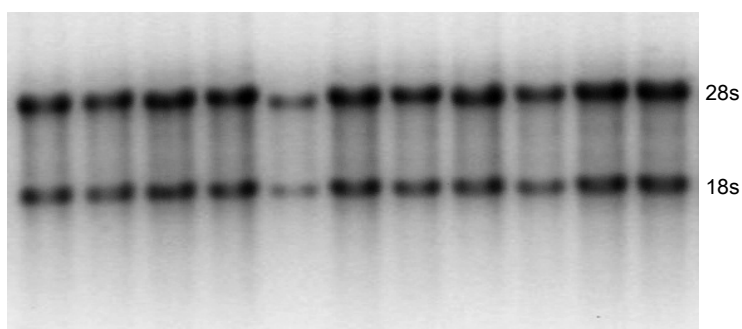


Figura 7. Ejemplo de la integridad del RNA extraído de los cultivos primarios de CaCu. Aproximadamente $1\ \mu\text{g}$ de RNA total (en cada carril) se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. Se muestran 11 diferentes alícuotas de RNA obtenidas de los cultivos de CaCu: JP, 085 y 354. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomal esperadas (28s y 18s).. En esta figura y en todas las siguientes que involucren geles de agarosa, se presenta la forma negativa de la fotografía digital obtenida originalmente.

RT-PCR estándar o de punto final

La identificación del mRNA de cada una de las subunidades α y β de los canales de sodio en los cultivos primarios y biopsias de cáncer, así como en las muestras de cérvix no canceroso, fue realizada mediante reacciones de transcripción inversa acoplada a la

reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), empleando *primers* específicos (oligonucleótidos que funcionan como “cebadores” en esta técnica) para cada gen (Tabla 1). Todos los *primers* fueron diseñados en este estudio utilizando el programa DNAsis Max (MiraiBio, Inc. Alameda CA). Como controles positivos se utilizó RNA total de cerebro (HB) y de la raíz del ganglio dorsal (DRG) de humano, comercialmente disponibles (BD Biosciences Clontech). Para detectar posible contaminación con DNA genómico, se incluyeron reacciones con *primers* comerciales para β -actina (Invitrogen) en las que se omitió la enzima transcriptasa inversa.

Subunidad	No. de acceso al GenBank	Secuencia de par de oligonucleótidos (5' – 3')		Temp. de Alineamiento	Tamaño (pb)
Nav1.1	NM_006920	S	TGGCAGTGTTCACGCGAATGG	64°C	656
		As	GGCGAGTCCAAGTTCTACCAGG		
Nav1.3	NM_006922	S	GGAGAGAGAGACAGCTTTCC	63°C	551
		As	CCAGAGGAATCCTCCAGCATC		
Nav β 1	NM_001037	S	GAGACCGAGGCCGTGTATGGGATG	66°C	593
		As	GCCCAGGGCCAGGGCTATT		
Nav β 2	NM_004588	S	CTGAAGCTGGAGCGGTTTCAA	60°C	342
		As	CTTGCCCTCCTCCTCGGTCT		
Nav β 3	NM_018400	S	GGTCAGAAAGTCGCCCTG	66°C	324
		As	CTCGGGCCTGTAGAACCATTC		
Nav β 4	NM_174934	S	CACGCCACCATCTTCCTCAA	65°C	284
		As	TGCAGCTGCTCAGCCCGAAG		

Tabla 1. Oligonucleótidos (*primers*) empleados en las reacciones de RT-PCR estándar. Se muestra la secuencia de cada uno de los pares de *primers* (sentido, S; y antisentido, As) utilizadas para investigar la expresión de las subunidades de los canales de sodio indicadas, en muestras de CaCu y de cervix no canceroso. También se indica la temperatura de alineamiento y el tamaño del amplicón esperado para cada gen.

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador programable Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Alemania), empleando el kit *Superscript One-Step* (Invitrogen) de la manera que se describe a continuación. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, incluyendo de 250 a 500 ng de RNA total, 1 μ l de la mezcla de enzimas RT/Platinum Taq, \sim 0.2–0.5 μ M de cada *primer*, y 25 μ l de amortiguador 2X. Éste a su vez contenía 0.4 mM de cada deoxi-nucleótido trifosfatado (dNTP) y 2.4 mM de MgSO₄. Las mezclas de reacción fueron sometidas a un programa de ciclado térmico dividido en dos etapas; en la primera se sintetizó el DNA complementario (cDNA) a 50°C durante 30 min. Posteriormente se amplificó el cDNA mediante una reacción de PCR que

consistió de un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos, cada uno consistente de tres fases: 15 s a 94°C, 30 s a la temperatura óptima de alineamiento (Tabla 1), y 30 s más a 72°C. La amplificación fue finalizada con un paso de elongación a 72°C por 7 min.

La identidad de los productos de amplificación se comprobó al digerirlos durante ~120 min con enzimas de restricción específicas (New Englan Biolabs, Beverly, MA). La enzima empleada y la temperatura a la que fue llevada cabo cada digestión son especificadas en la Tabla 2. El tamaño de los productos amplificados, así como el de los fragmentos resultantes de las digestiones, fue determinado por electroforesis en geles de agarosa al 1-2%, y visualizados por tinción con bromuro de etidio, comparándolos con marcadores de tamaño molecular (*Ladder* de 100 pb, New England Biolabs), empleando TBE al 0.5X como solución amortiguadora de corrida.

Subunidad	Enzima de restricción	Temp. de digestión	Fragmentos esperados (pb)
Nav1.1	<i>Apo I</i>	50°C	331 y 325
	<i>BamH I</i>	37°C	83 y 573
Nav1.3	<i>Apo I</i>	50°C	101 y 450
Navβ1	<i>Pvu II</i>	37°C	160 y 433
Navβ2	<i>Hpa II</i>	37°C	89 y 253
Navβ3	<i>BsmBI</i>	55 °C	111 y 213
Navβ4	<i>Sac I</i>	37°C	99 y 185

Tabla 2. Enzimas de restricción empleadas en la digestión de los productos obtenidos por PCR estándar. Con base en el análisis de las secuencias de cada uno de los genes investigados (columna Subunidad), se predijo el numero y tamaño de los fragmentos que se obtendrían como producto de la digestión de cada cDNA con las enzimas indicadas. Nótese que algunas enzimas requieren temperaturas más altas (50°C) de la usual (37°C) para digerir el DNA.

Con el fin de confirmar la identidad molecular de cada uno de los fragmentos amplificados (amplicones), se procedió a su clonación y posterior secuenciación. Los amplicones fueron clonados en el vector pCR®4 usando el kit Zero Blunt® TOPO® PCR cloning (Invitrogen) (Fig. 8) como a continuación se detalla. De la reacción de PCR se usó el volumen equivalente a ~10 ng del amplicón (utilizando como guía la densidad óptica de las bandas del marcador de peso molecular) y se subclonó en el vector pCR®4, en presencia de sales

de Mg^{2+} para hacer más eficiente la reacción. Los plásmidos resultantes de la clonación se usaron para transformar bacterias *E. coli* químicamente competentes de la cepa TOP10, por el método de choque térmico (Sambrook J. & Rusell D, 2001). Las bacterias transformadas fueron capaces de crecer en medio Luria-Bertoni (LB) sólido, en presencia de ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Así, después de la transformación se eligieron algunas colonias para propagarlas en medio LB líquido, con la misma concentración de antibiótico, para amplificar el plásmido de interés. Se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook J. & Rusell D, 2001) y una pequeña alícuota fue sometida a digestión con la enzima *EcoR* I que permitió liberar el fragmento insertado en el vector. Luego de comprobar por su tamaño en un gel de agarosa al 1%, que se trataba de los fragmentos de interés, algunos de los plásmidos se eligieron para secuenciar de manera automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando el *primer* T7 (Fig. 8).

Posteriormente, se determinó el porcentaje de identidad de cada amplicón secuenciado, comparándolo con la secuencia reportada en el GenBank, haciendo el alineamiento de cada par de secuencias con el programa LALIGN de uso gratuito en Internet (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

En el caso particular de $Na_v\beta_2$, en las biopsias de CaCu se detectaron varios amplicones de tamaños muy similares al tamaño de banda esperado (detectado en el control positivo), por lo que éstos fueron analizados con mayor detalle. Primero, los diferentes amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, escindidos del gel, y purificados por columnas de afinidad empleando el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA purificado de esta manera se utilizó como molde para su (re) amplificación mediante PCR estándar. Cada reacción fue realizada en un volumen final de 50 μl , incluyendo 5 de los 20 μl obtenidos de la purificación de cada amplicón, 1 U de la polimerasa Deep Vent (New England Biolabs), $\sim 0.2\text{--}0.5\ \mu\text{M}$ de cada oligonucleótido (iguales a los usados en las reacciones de RT-PCR), 0.2 mM de deoxi-nucleótidos trifosfatados (dNTPs), y 5 μl del amortiguador 10X ya mencionado. Las mezclas de reacción fueron sometidas a un programa de ciclado térmico que consistió de un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 45 ciclos consistentes de tres fases: 15 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, y finalizado con un paso de extensión a 72°C durante 7 min. Posteriormente, se corroboró la identidad de los amplicones mediante digestión enzimática seguida bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y se procedió a su clonación para posterior secuenciación, de

la misma manera que fueron clonados y secuenciados los fragmentos amplificados por RT-PCR.

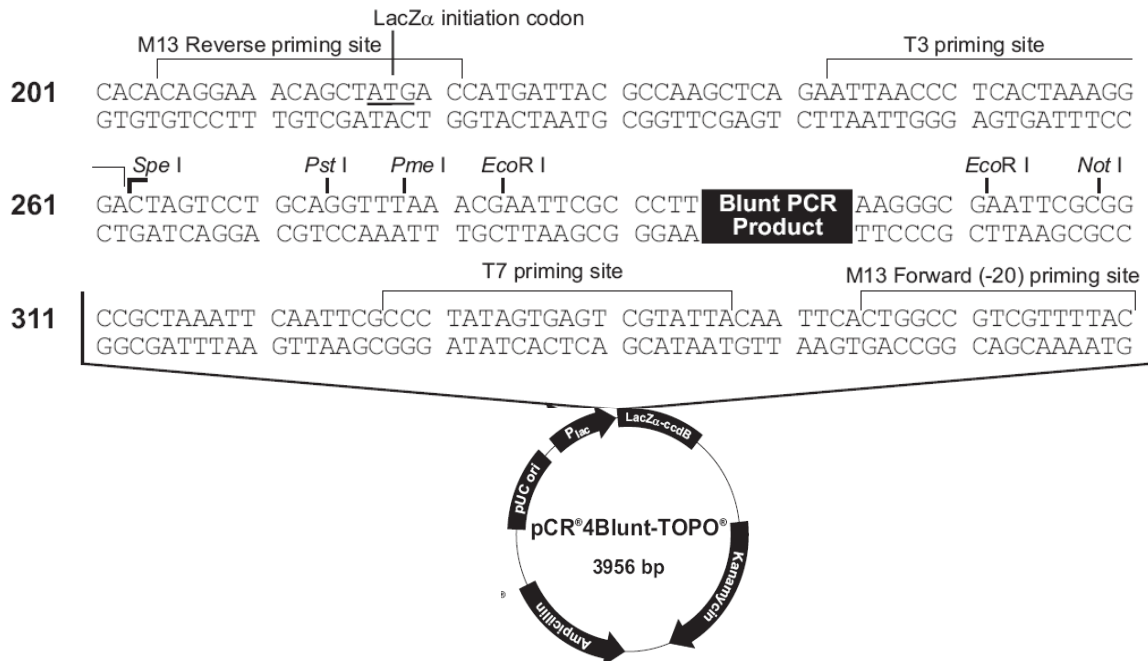


Figura 8. Mapa del vector pCR®4. Se muestra un esquema de la composición general del vector en el que fueron clonados los fragmentos de las subunidades N_{av} amplificados por RT-PCR estándar. En el recuadro negro se muestra el lugar en el que se insertó cada fragmento, mismo que fue secuenciado con el *primer* T7, cuya secuencia de unión al plásmido también se indica en el esquema.

RT-PCR en Tiempo Real

La expresión diferencial de los canales N_{av} en los cultivos primarios y las biopsias de CaCu, así como en el tejido cervical no canceroso, se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, utilizando ensayos (pares de *primers* y sonda fluorescente) de la tecnología “Taq Man” específicos para cada uno de los genes de interés de este proyecto: $N_{av1.1}$, $N_{av1.2}$, $N_{av1.3}$, $N_{av1.6}$, $N_{av1.7a}$, $N_{av1.7b}$, $N_{av\beta1}$, $N_{av\beta2}$, $N_{av\beta3}$ y $N_{av\beta4}$. Asimismo, se incluyó un ensayo comercialmente disponible para β -actina como control (Tabla 3). Los ensayos fueron sintetizados por la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA), y cada uno de ellos consistió de una sonda hidrolítica complementaria a un fragmento de cada gen, flanqueada por un par de *primers*. La sonda contiene un compuesto fluorogénico reportero FAM (6-carboxifluoresceína) unido covalentemente al extremo 5', cuya fluorescencia es absorbida antes de que se inicie la reacción de PCR por el apagador no fluorescente NFQ, localizado en el extremo 3' de la sonda. El diseño

general de estos ensayos, también denominados sondas TaqMan se muestra en la Fig 9. Las ventajas del empleo de la técnica de PCR en Tiempo Real respecto a la PCR convencional, así como información acerca del fundamento y análisis de los datos se detallan en el Apéndice A de esta disertación.

Al igual que en el caso de las amplificaciones por PCR estándar, los amplicones obtenidos por PCR en Tiempo Real fueron clonados para ser secuenciados y de esta manera corroborar su identidad molecular. Para ello, una vez finalizada la reacción de amplificación, los fragmentos de PCR fueron purificados utilizando columnas del kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, como ya se menciona anteriormente. En este caso, los amplicones fueron clonados en el vector pCR®8, usando el kit GW/TOPO® TA Cloning® (Invitrogen) (Fig. 10). El empleo de este vector en particular se debe a que, a diferencia de los productos obtenidos por PCR estándar, los fragmentos de DNA amplificados por PCR en tiempo real contienen terminaciones de adeninas colgantes, es decir, sin la complementación correspondiente en la hebra hermana de DNA.

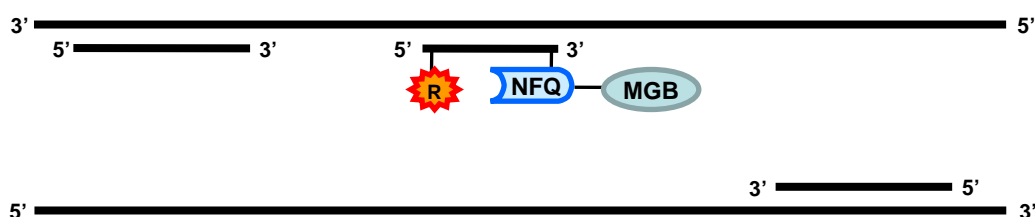


Figura 9. Esquema general de los componentes de un ensayo TaqMan. Se muestran los *primers* sentido y antisentido como líneas cortas alineadas en los extremos de cada hebra del DNA, delimitando el fragmento a amplificar. La sonda hidrolítica marcada fluorogénicamente se diseña de tal manera que se una en la región central del fragmento que se quiere amplificar. **R**: Reportero; **NFQ** (non fluorescence quencher): Apagador de la fluorescencia; **MGB** (minor groove binder): estabilizador de la sonda.

Subunidad	No. de acceso al GenBank	Secuencia de par de <i>primers</i> y sonda (5' – 3')		Tamaño (pb)
Na _v 1.1	NM_006920	S	GAGCAATGAGTATAGCCAGCATTCTA	80
		As	AAATGCCACCCTGTTGGT	
		Son	TGAAGAATCCAGGCAG	
Na _v 1.2	M94055	S	TGGTCATTTTCTTGGGCTCATTCT	82
		As	CCTATGAGGAACAGAATCAGGCC	
		Son	TGATCTTGGCTGTGG	
Na _v 1.3	NM_006922	S	AGACGCAATAGCAAAACAAGCATTT	75

		As	TGTTGGATCTGAAAATGACTTTGCTG	
		Son	CAGTTTCAGAGGTCCG	
Nav1.6	AF225988	S	GGGATCCATGGAAGTGGTTAGATTT	108
		As	AACATTCAGGGTTCTCCGAGC	
		Son	AGTTTGTGGACCTGGG	
Nav1.7a	X82835	S	GCAATGTTTCAGCTCTTCGAACTT	73
		As	TATTTCTGTAATCCCAGGCCTGAAG	
		Son	GAGTATTGAGAGCTTTGAAAA	
Nav1.7b	X82835	S	GGGCAATGTCTCAGCGTTGA	82
		As	GTCATTCCAGGACTAAAGACCATCG	
		Son	GAGTTCTCCGAGCAT	
Nav β 1	NM_001037	S	GGAGGATGAGCGCTTCGA	69
		As	ACCAAAGACCTGCAGGATCTG	
		Son	AATGGCAGCCGGGG	
Nav β 2	NM_004588	S	TGCAGCCGGAGGATGAG	91
		As	CAAGATCCATCTGCAGGTCCTC	
		Son	CCCCTGACCGCCACCG	
Nav β 3	NM_018400	S	CGCCAGCCCCAGAAGAT	89
		As	TCAGTGTCTGCTTCCCTGTG	
		Son	TTTCCCCTGGCTTCTC	
Nav β 4	NM_174934	S	AAGAAGTGGACAACACAGTGACA	92
		As	CTCATCCTGCTGATCAAGAACTCA	
		Son	CTGTCGTGGGCGGGGT	

Tabla 3. Ensayos TaqMan empleados en las reacciones de PCR en Tiempo Real. Se indica la secuencia del *primer* sentido (S), del *primer* antisentido (As) y de la sonda (Son) utilizados para cada gen estudiado. A la extrema derecha se muestra el tamaño del amplicón esperado para cada gen.

Para realizar la transformación se usó la misma cepa TOP10 de *E. coli*, pero el antibiótico de selección en este caso fue la espectinomicina, tanto para el crecimiento bacteriano en el medio sólido como en el medio líquido. De igual manera, se obtuvo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina, se digirió por ~120 min con la enzima *EcoR* I, y se eligieron algunos de ellos para ser secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto, usando el *primer* T7 o el GW1 (Fig. 10).

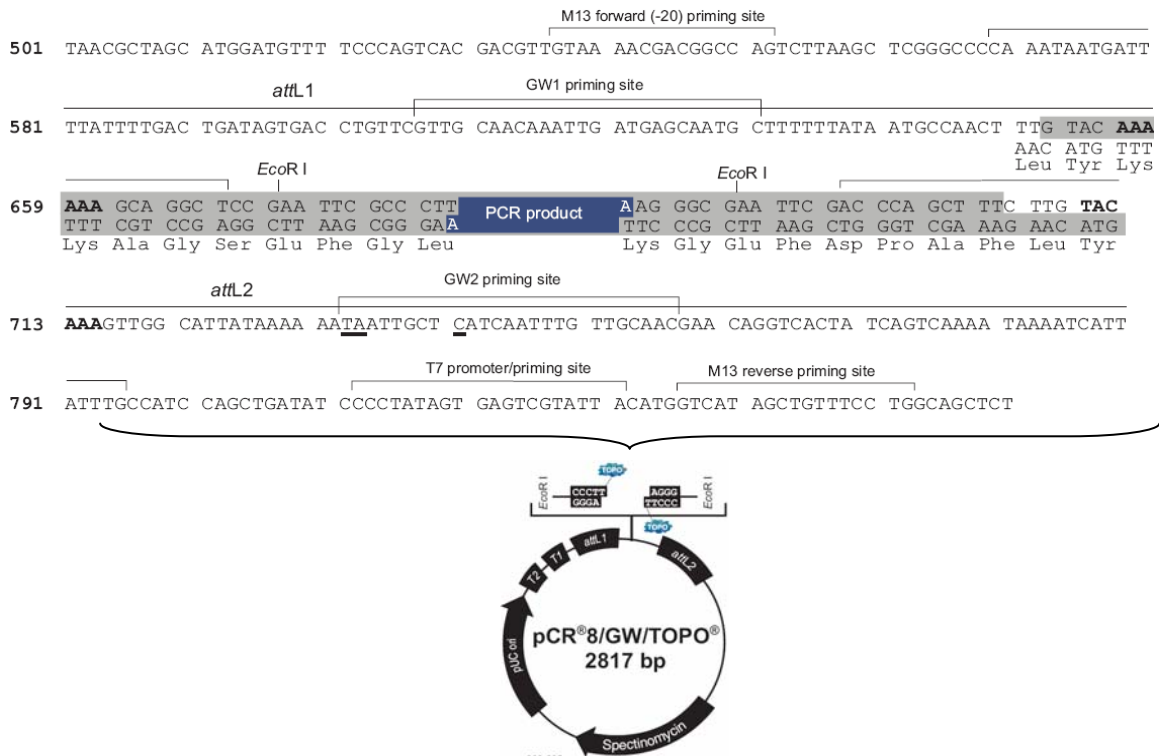


Figura 10. Mapa del vector pCR®8. Se muestra un esquema de la composición general del vector en el que fueron clonados los fragmentos de las subunidades Na_v amplificados por PCR en Tiempo Real. El recuadro azul (marcado como PCR Product) muestra el sitio en el que se insertó cada fragmento, el cual puede ser liberado mediante la digestión de la construcción con la enzima *EcoR* I. Además, el fragmento ligado puede ser secuenciado con cualquiera de los cuatro *primers* que flanquean el sitio de clonación del fragmento de PCR.

Rangos dinámicos

Los rangos dinámicos son una serie de experimentos de PCR en Tiempo Real que se realizan previos a la cuantificación *per se* de los genes de interés, y que tienen como finalidad determinar la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de ellos, y conocer la concentración máxima y mínima en la cual el molde (cDNA) puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Para tal efecto se utilizaron 3 microgramos de RNA total de la muestra

CaCu 354 (de la cual se contaba con la mayor cantidad de RNA total) para sintetizar cDNA utilizando los reactivos del estuche *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo, además del RNA, 1 µl de la retrotranscriptasa MultiScribe, 2 µl de amortiguador para la enzima, 0.8 µl de dNTPs (100 mM) 25X, 2 µl de *random primers* (oligonucleótidos de 6 a 10 pb de secuencia aleatoria que permiten la retrotranscripción de cualquier molécula de RNA presente en la muestra), 1 µl de inhibidor de RNasas, y H₂O suficiente para llevar la reacción a 20 µl. Las mezclas fueron sometidas a un programa térmico que consistió de

tres etapas: un primer paso de 10 min a 25 °C, seguido de 120 min a 37 °C, y finalizado con 5 s a 85 °C. El cDNA sintetizado se almacenó a -20°C para su uso posterior.

A cada producto directo de la retrotranscripción del RNA se le agregaron 20 µl de H₂O, y se le denominó cDNA *stock*; a partir de él se prepararon cuatro diluciones seriales 1:2, es decir, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, mismas que se utilizaron para preparar reacciones de PCR en tiempo real usando el ensayo (par de *primers* y sonda) correspondiente para cada gen. Cada reacción fue preparada por triplicado en un volumen final de 15 µl, conteniendo 3 µl de cDNA, 0.6 µl de ensayo, 3.9 µl de agua, y 7.5 µl del cóctel *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que aseguró una mezcla uniforme y siempre constante de todos los componentes necesarios para las reacciones de PCR en todas las muestras. Para corroborar la ausencia de contaminantes en la reacción, así como la integridad y estabilidad de los ensayos, en todos los casos se corrió al mismo tiempo un control negativo (NTC), en el que se sustituyó el cDNA por agua. Las reacciones fueron distribuidas individualmente en placas multipozos de 96 y cubiertas con tapas plásticas adhesivas (Applied Biosystems) y se sometieron a un programa de variación térmica que consistió de: un primer paso de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C para activación enzimática y desnaturalización del cDNA, y finalmente de un paso de 45 - 50 ciclos consistentes a su vez de dos fases: 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. El proceso de termociclado se realizó en un equipo para PCR en tiempo real ABI Prism 7300, acoplado a una computadora que contiene el software SDS 1.2.2 (Applied Biosystems) para la adquisición y análisis de resultados.

Al final de la reacción de PCR se fijó el umbral (línea sobre el eje las abscisas, unidades relativas de fluorescencia) común para todas las amplificaciones y se determinó el valor de C_T (threshold cycle) de cada una de las reacciones con ayuda del software del equipo. Se obtuvo el C_T promedio de los triplicados de cada muestra, y se determinó la desviación estándar. En los casos en que la desviación estándar fue mayor a 0.4 se repitió el rango dinámico.

Evaluación de la eficiencia de la reacción de PCR

Los valores promedio de C_T fueron tomados como valores unitarios para construir el gráfico del rango dinámico, y así determinar la eficiencia de la reacción de PCR para cada ensayo de la siguiente manera. Primero, se corroboró que la diferencia en el valor de C_T

de la reacción de cada dilución correspondiera con la cantidad de cDNA utilizada, esto se llevó a cabo empleando la ecuación general de la PCR ideal:

$$P_n = T_i \times 2^n \quad \text{Ecuación 1}$$

en donde P_n es la cantidad de producto en el ciclo “ n ” y T_i la cantidad inicial de molde. Esta condición se cumple cuando la reacción de PCR es 100% eficaz, es decir, cuando por cada ciclo que avanza la reacción de PCR, se duplica la cantidad de DNA presente en la misma, lo cual ocurre en la fase exponencial de la reacción (ver Apéndice A).

Teniendo en cuenta las diluciones seriales del cDNA utilizadas en el presente estudio, se puede conocer la diferencia en la cantidad de molde presente inicialmente en cada una de ellas, por lo que, es posible determinar la diferencia en el número de ciclos a los que amplificará cada muestra; de esta manera, despejando a “ n ” de la ecuación de la PCR tenemos que:

$$n \text{ (No. Ciclos)} = \frac{\text{Log magnitud de la dilución}}{\text{Log 2}}$$

En el caso particular de un rango dinámico montado con diluciones seriales constantes de 1:2, al sustituir los valores en la ecuación, tenemos que:

$$n \text{ (No. Ciclos)} = \frac{\text{Log 2}}{\text{Log 2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Por lo que, en el caso de la presente investigación deberá haber una diferencia de 1 ciclo en la fase exponencial de la PCR de cada reacción. Esto fue corroborado al graficar los valores promedio de C_T de cada reacción de cada uno de los rangos dinámicos, en función de la cantidad relativa de cDNA presente en la reacción (con base en las diluciones seriales).

La eficiencia de la reacción de PCR se puede ver influencia por algunos factores (error de pipeteo, manipulación de las muestras, etc), por lo que no en todos los casos es del 100%, de tal forma que no siempre se puede aplicar la fórmula general de la PCR para determinar la cantidad de producto en un ciclo “ n ”. Es así como la ecuación que mejor

describe las condiciones reales de la reacción, permitiendo conocer la cantidad de producto en el ciclo “n” es la siguiente:

$$P_n = T_i (1 + E)^n \quad \text{Ecuación 3}$$

en donde la Ecuación 1 es modificada por el parámetro E que significa la eficiencia de la reacción de PCR. Despejando a “ E ” en función de la pendiente del gráfico del rango dinámico, podemos conocer la eficiencia de la reacción de PCR de cada ensayo:

$$E = 10^{(1/S)} - 1 \quad \text{Ecuación 4}$$

en donde S es el valor de la pendiente. Así, los puntos del gráfico de cada rango dinámico fueron ajustados a una recta por regresión lineal; se obtuvo la ecuación de la recta, y se sustituyó el valor de la pendiente en la ecuación anterior, para determinar la eficiencia de la reacción de cada uno de los ensayos.

Determinación de la abundancia relativa del mensajero de cada gen

Una vez establecido el rango dinámico y la eficiencia de reacción de PCR de todos los ensayos, se decidió utilizar una dilución 1:4 del cDNA *stock* de todas las muestras, para cuantificar las diferencias en la expresión de cada gen entre cada una de ellas. Para ello se prepararon reacciones de PCR en Tiempo Real por triplicado, incluyendo los NTCs correspondientes para cada ensayo, de la misma manera en la que se hicieron las reacciones de los rangos dinámicos descritas anteriormente. La única diferencia consistió en utilizar 3 μ l de la dilución 1:4 del cDNA *stock* de cada muestra.

Una vez finalizada la reacción de PCR se fijó un mismo umbral para todas las muestras, utilizando para ello la opción de Auto C_T incluida en el programa SDS 1.1.2. Así, el programa proporcionó los valores de C_T de cada reacción, con los que se calculó la media de los triplicados de cada muestra. El análisis de la abundancia relativa del mensajero de cada gen entre las distintas muestras se determinó mediante el método de “delta, delta C_T ” ($\Delta\Delta C_T$; ver Apéndice A) (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando los valores de la expresión de Nav1.1 como gen normalizador.

RESULTADOS

Expresión de subunidades de canales de sodio en CaCu

Previamente, nuestro laboratorio reportó la presencia de las subunidades $Na_v1.2$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ de los canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a la TTX en cultivos primarios y biopsias de CaCu (Diaz et al., 2007). Para completar dicha información, en el presente trabajo se investigó la presencia del resto de las subunidades α que dan lugar a canales de sodio sensibles a la TTX (es decir, $Na_v1.1$ y $Na_v1.3$), así como las subunidades accesorias β de dichos canales. Una vez identificadas, se procedió a realizar un estudio de expresión génica para determinar la abundancia relativa de cada subunidad tanto en el CaCu como en el tejido no canceroso de cervix.

Las amplificaciones por PCR estándar con RNA total de los cultivos primarios de CaCu, revelaron la presencia de $Na_v1.1$ y $Na_v1.3$ y de las cuatro subunidades accesorias $Na_v\beta1$, $Na_v\beta2$, $Na_v\beta3$ y $Na_v\beta4$ (Fig. 11). En la amplificación de $Na_v1.1$ y $Na_v1.3$ se obtuvieron varios amplicones, que corresponden a distintas isoformas de estos genes. La amplificación de la subunidad $Na_v\beta2$ también generó amplicones de diferente tamaño, sin embargo, en este caso, la intensidad de la banda esperada (342 pb) fue muy débil, comparada con la del control (RNA de cerebro), e incluso con la de un amplicón de aproximadamente 300 pb que se detectó en cada uno de los cultivos primarios de CaCu (Fig. 11). Cabe hacer notar que ambos amplicones (300 y 342 pb) fueron purificados, subclonados y secuenciados; sin embargo, todas las clonas obtenidas contenían el amplicón de 300 pb, cuya secuencia solo comparte 53% de similitud con la reportada en el GenBank (ver Tabla 5). La ausencia de clonas conteniendo el fragmento de 342 pb pudo deberse a la escasa cantidad del fragmento amplificado (Fig. 11), no obstante, la presencia de la subunidad $Na_v\beta2$ en los cultivos primarios y en las biopsias de CaCu quedó demostrada con los experimentos de PCR en Tiempo Real como se mostrará más adelante (ver Fig. 22).

Con la finalidad de constatar la identidad molecular de cada una de los fragmentos amplificados por RT-PCR de cada una de las subunidades estudiadas se procedió a su caracterización con enzimas de restricción y secuenciación automática. En primer lugar, los

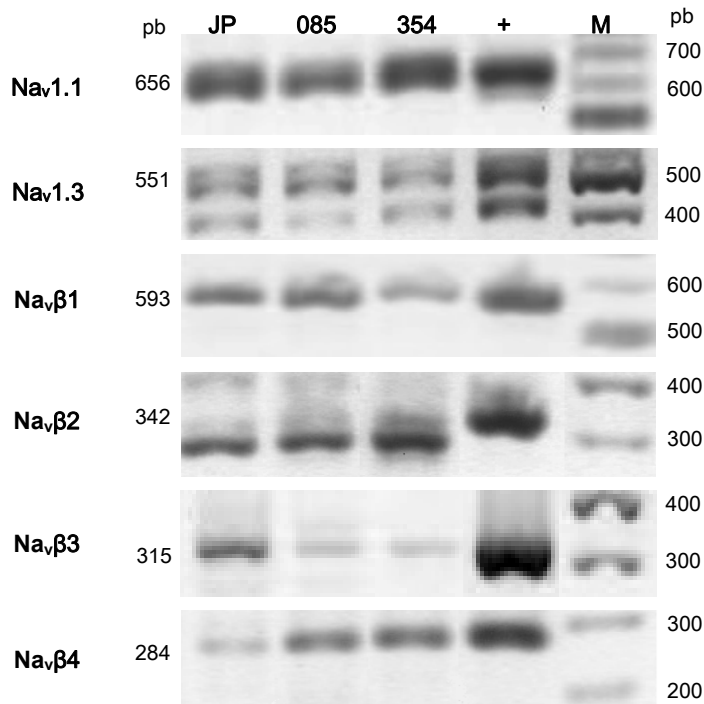


Figura 11. Expresión de subunidades de canales de sodio en cultivos primarios de CaCu. Resultados de reacciones de RT-PCR en un solo paso, en las que se utilizaron *primers* específicos para las subunidades que se indican a la izquierda de la figura. Cada mezcla de reacción incluyó 250-500 ng de RNA total de cultivos primarios de CaCu (JP, 085 y 354) o de cerebro de humano (control positivo, +). Después de los 40 ciclos de amplificación, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular de 100 pb. Los números de la izquierda indican el tamaño de banda esperado para cada gen. Como se esperaba, en el caso de $\text{Na}_v1.1$ se detectaron dos isoformas en cada amplificado, mientras que para $\text{Na}_v1.3$ se obtuvieron tres amplicones distintos. En el caso de $\text{Na}_v\beta2$, el fragmento amplificado en los cultivos primarios de CaCu fue de un menor tamaño que el encontrado en el control positivo.

amplicones fueron digeridos con enzimas de restricción específicas para cada uno de ellos. Las digestiones generaron el patrón de bandas esperado de acuerdo a las secuencias reportadas en el GenBank para cada gen. En la Tabla 2 se especifica el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión de cada amplicón expresado en las muestras de CaCu, y en la Fig. 12 se muestra un ejemplo de los productos obtenidos con las digestiones enzimáticas. En segundo lugar, cada amplicón fue clonado en el vector pCR[®]4 y propagado en bacterias *E. coli* para ser secuenciado. En la Fig. 13 se ilustra un resultado típico, ejemplificado con los amplicones de la subunidad $\text{Na}_v1.1$, mismos que se obtuvieron al someter a digestión con la enzima *EcoR* I al vector con el fragmento clonado y su posterior separación por electroforesis.

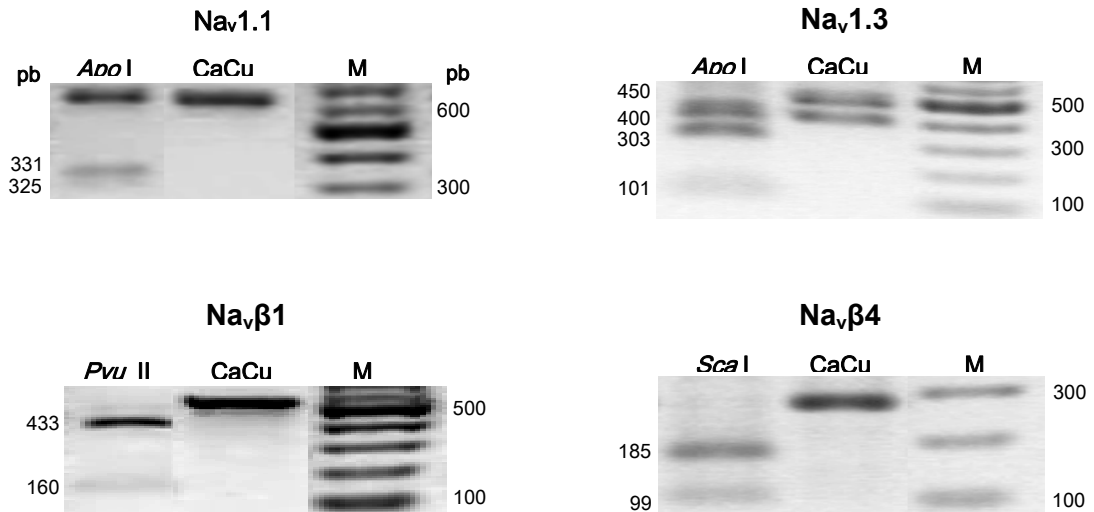


Figura 12. Digestión enzimática del cDNA amplificado de subunidades de canales de sodio expresados en CaCu. Separación mediante electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos resultantes (carriles de la izquierda) de la digestión de los productos de PCR (carriles de en medio) con las enzimas indicadas para dos subunidades α y dos β . M, marcador de peso molecular en incrementos de 100 pb. A la izquierda de cada panel se muestra el tamaño de cada uno de los fragmentos esperados por la digestión del cDNA respectivo.

Varias clonas de cada muestra fueron seleccionadas para ser secuenciadas con ayuda del *primer* universal T7. Las secuencias resultantes se compararon con las reportadas en el GenBank para cada gen, y de esta manera se logró la identificación de los genes y las isoformas expresadas en cada una de las muestras estudiadas. En el caso de $Na_v1.1$ se detectaron dos isoformas distintas en los cultivos primarios de CaCu, ambas reportadas en el GenBank. En la Fig. 14 se muestra la comparación de la secuencia de los fragmentos de $Na_v1.1$ detectados en CaCu, y de manera particular en las células del cultivo 085.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior, se secuenciaron varias clonas de cada gen, así como de los tres cultivos primarios de CaCu. Se realizaron los alineamientos respectivos con todas las secuencias reportadas en el Gen Bank para las distintas isoformas de los genes de interés y los resultados se presentan de manera resumida en la Tabla 5.

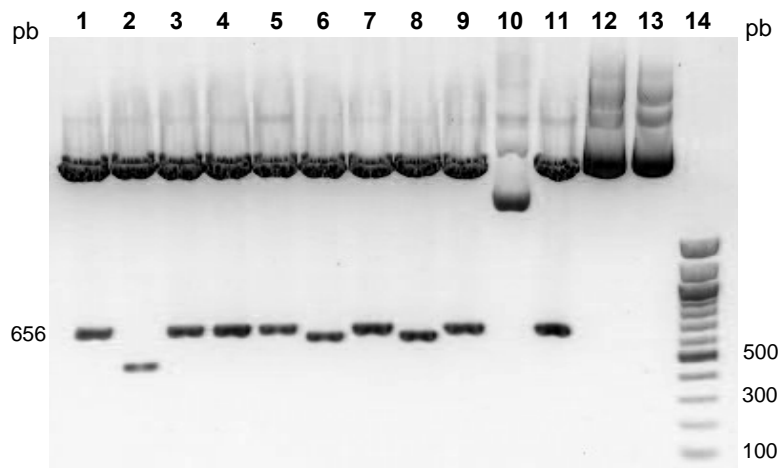


Figura 13. Liberación del fragmento de Nav1.1 clonado en el vector pCR®4. El DNA plasmídico (vector más fragmento clonado) obtenido por lisis alcalina fue digerido con *EcoR* I y los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 - 5: Nav1.1 expresado en CaCu 354; carriles 6 - 10: Nav1.1 expresado en HB; carril 11: Nav1.1 expresado en JP; carriles 12 y 13: controles negativos de digestión (DNA plasmídico conteniendo Nav1.1 expresado en JP y HB no digeridos); 14: marcador de peso molecular de 100 pb. En los carriles 2, 6 y 8 se pueden apreciar fragmentos de un de tamaño menor en comparación con el del amplicón más abundante (656 pb). Como se pudo corroborar posteriormente por secuenciación, esto fue debido a la expresión de distintas isoformas del gen por una misma población celular.

Las secuencias de los productos de PCR amplificados de todas las subunidades detectadas, excepto la de Nav β 2, coincidieron con la identidad molecular previamente reportada para cada una de ellas en el GenBank. Adicionalmente, la secuencia de algunos amplicones de los genes Nav1.3 (isoforma 1) y Nav β 1 (isoforma 2) presentaron diferencias importantes (entre 10 y 14%) con respecto a las secuencias reportadas. Tales diferencias no se estudiaron con mayor detalle en el presente estudio. En el caso de Nav β 2, los amplicones detectados en los tres cultivos primarios no correspondieron a la secuencia reportada para este gen (sólo 53% de similitud). El resultado de un alineamiento con las secuencias reportadas en el GenBank (BLAST) indicó que el fragmento amplificado comparte la mayor similitud con un RNA ribosomal 28s de humano (LOC100008589). Por lo anterior, concluimos que el fragmento de 300 pb amplificado con los *primers* para Nav β 2 no corresponde a dicha subunidad, y como se mostrará más adelante, la banda menos intensa de 342 pb si es indicativa de la presencia de la subunidad Nav β 2 en los cultivos primarios de CaCu, aunque ésta sea poco expresada en comparación con el resto de las subunidades de canales de sodio (ver Fig. 24B).



Figura. 14. Alineamiento de las secuencias del cDNA de las isoformas de Nav1.1 expresadas en CaCu 085. A la izquierda se muestra el nombre de las secuencias. Los alineamientos se realizaron con el programa DNAsis. NM_006920 y AB093548 son secuencias reportadas de isoformas de Nav1.1: mientras que 085 (1) y 085 (2) son las secuencias de dos fragmentos de distinto tamaño (623 y 656 pb) amplificadas por RT-PCR estándar utilizando *primers* específicos para el gen de Nav1.1. La diferencia entre ambas isoformas se evidencia en la tercera fila del alineamiento. La isoforma NM_006920, y la clona 085 (2), no presentan 33 nucleótidos, lo que se traduce en la ausencia de 11 aminoácidos en el asa intracelular que une a los dominios I y II de la subunidad α del canal de sodio. El color amarillo sobre los alineamientos indica 100% de similitud entre las secuencias alineadas; el verde que al menos una de las secuencias es diferente; y la ausencia de color que no hay similitud entre secuencias contiguas.

Gen	Clona	Isoforma	No. de acceso al GenBank	% de identidad
-----	-------	----------	--------------------------	----------------

Nav1.1	CaCu 085-1	1	AB093548	99.8
	CaCu 085-2	2	NM_006920	99.7
	CaCu 354-4	2	NM_006920	99.8
Nav1.3	CaCu 085-7	1	NM_006922	90.5
	CaCu 085-10	2	NM_006922	100
	CaCu 085-12	3	NM_001081676	97.3
Navβ1	CaCu JP-6	1	NM_001037	100
	CaCu JP-10	2	NM_001037	86.1
Navβ2	CaCu JP	-	NM_004588	52.7
	CaCu 085	-	NM_004588	52.7
	CaCu 354	-	NM_004588	52.7
Navβ3	CaCu 354-7	1	NM_018400	99.7
Navβ4	CaCu 354-10	1	NM_174934	100

Tabla 5. Porcentaje de identidad entre las secuencias de los fragmentos amplificados de Nav1.1, Nav1.3, Navβ1, Navβ2, Navβ3 y Navβ4 detectadas en CaCu y las reportadas en el GenBank. Los alineamientos se realizaron con LALIGN. En el caso de Navβ2 la secuenciación del fragmento esperado mostró un bajo porcentaje de identidad con la secuencia reportada

El siguiente paso fue demostrar que las subunidades de canales de sodio detectadas en los cultivos primarios derivados de biopsias de CaCu, también podían ser detectadas en el RNA total extraído directamente de biopsias de CaCu provenientes de otros pacientes. Siguiendo el mismo procedimiento experimental se analizaron seis biopsias de CaCu adicionales y el resumen de los resultados se muestra en la Fig. 15A. Con ligeras diferencias en la intensidad de los fragmentos amplificados, se corroboró el mismo patrón de expresión que en los cultivos primarios. De igual manera se estudiaron seis muestras de cérvix uterino no canceroso (Fig. 15B), en las que no se detectó la expresión de ninguna de las subunidades estudiadas, excepto por Navβ3 que fue detectada en una de las seis biopsias (la identificada con el número 4). Interesantemente, esta última proviene de una paciente con una patología de displasia (ver Apéndice B), por lo que probablemente la subunidad Navβ3 pudiera tener una mayor expresión en etapas tempranas precursoras del CaCu.

A diferencia de los cultivos primarios, en las biopsias de CaCu la expresión del amplicón correspondiente a la subunidad Navβ2 fue más evidente, de tal manera que se procedió a purificar y amplificar dichos amplicones con otra reacción de PCR (Fig. 16). Posteriormente, los amplicones fueron digeridos con enzimas de restricción, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y una vez que se comprobó que el patrón de

bandas generado correspondía con la secuencia reportada para el gen, se procedió a su clonación y secuenciación respectiva, (Fig. 17). Los resultados de las últimas dos figuras demuestran de manera contundente que la subunidad $\text{Na}_v\beta 2$ también es expresada en las biopsias de CaCu.

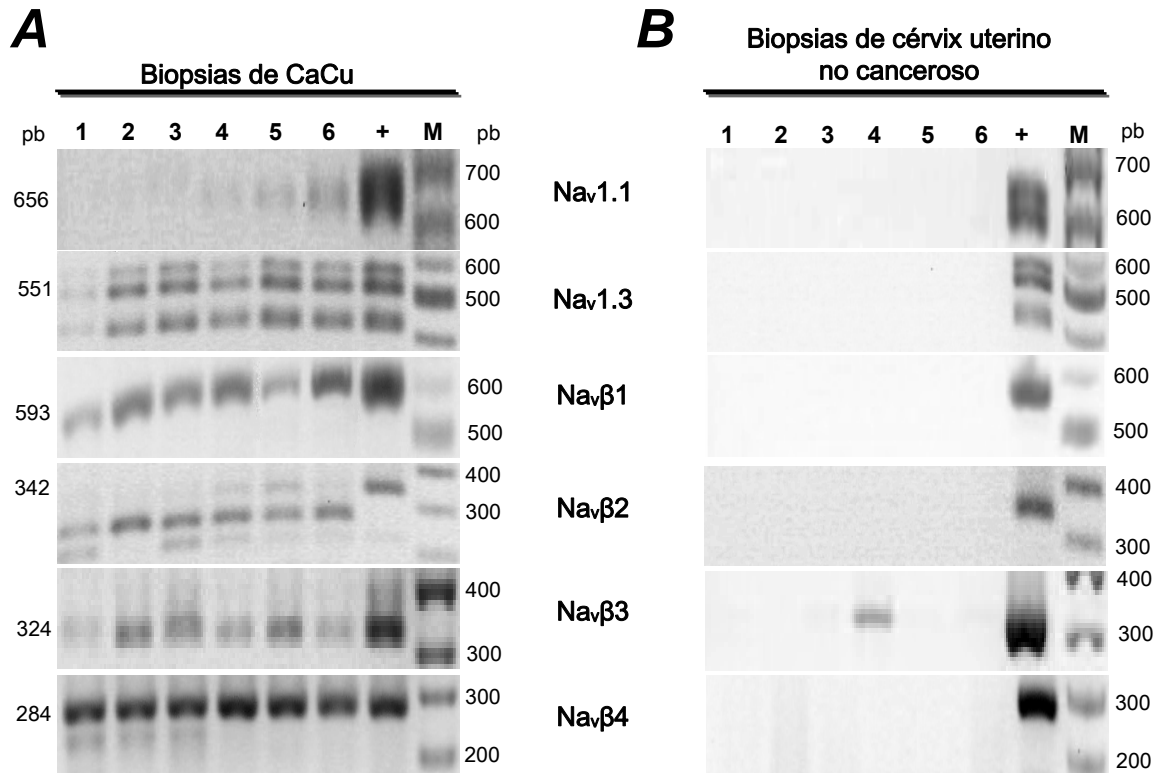


Figura 15. Expresión de subunidades de canales de sodio en biopsias de CaCu y de cérvix no canceroso. El RNA total de biopsias de cérvix con CaCu (**A**), así como de cérvix no canceroso (**B**), se analizó mediante RT-PCR en un solo paso, empleando los mismos *primers* que en la Fig. 11. Nótese que la expresión en las biopsias de CaCu es prácticamente la misma que la detectada en los cultivos primarios derivados del mismo cáncer. En las biopsias del tejido uterino no canceroso se detectó la presencia de $\text{Nav}_{\beta 3}$ en sólo una muestra (4). La separación de los productos de PCR por electroforesis se realizó en las mismas condiciones que la Fig. 11.

En resumen, los resultados expresados hasta el momento muestran, por primera vez, que en el cáncer cervical se expresan las seis subunidades α de los canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a la TTX, así como las cuatro subunidades reguladoras β descritas hasta el momento. El siguiente paso fue determinar la abundancia relativa de cada una de ellas por PCR en Tiempo Real, para lo cual, se diseñaron ensayos específicos para la detección de cada gen analizado por RT-PCR estándar.

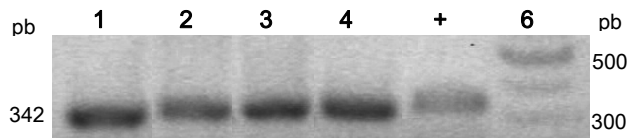


Figura 16. Reacción de PCR para amplificar Navβ2. Se utilizó como molde los amplicones generados por RT-PCR en las biopsias de CaCu de la Fig. 15A; las condiciones de reacción fueron las mismas que en dicha figura. Carriles 1-4: fragmentos de cDNA correspondientes a las muestras 1, 2, 3 y 6 de la Fig. 15A; carril 5 (+): control positivo (cerebro de humano), y carril 6: marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la Fig. 11.

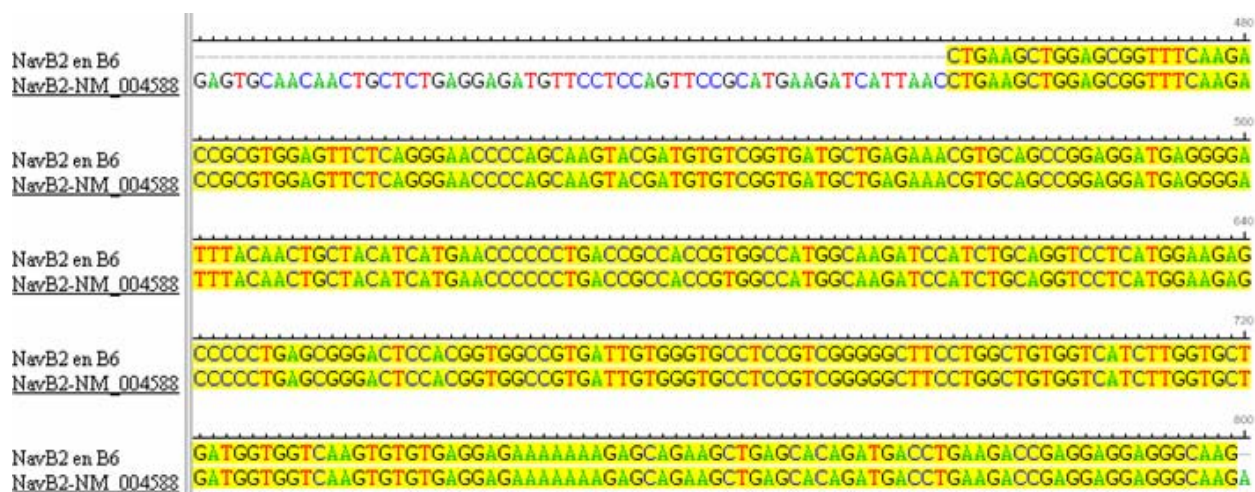


Figura 17. Secuencia del fragmento de Navβ2 identificado en una de las biopsias de CaCu. La secuencia con el nombre de “NavB2 en B6” corresponde a la biopsia de CaCu identificada con el número 6 en la Fig. 15. La secuencia “NavB2-NM_004588” es la secuencia reportada en el GenBank. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa DNAsis.

Abundancia relativa de subunidades de canales de sodio en CaCu

Mediante la generación de rangos dinámicos se pudo obtener la eficiencia de la reacción de PCR en cada ensayo, misma que fue mayor al 90%, lo que hizo posible la comparación de la abundancia relativa de la expresión de cada uno de los genes mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. En la Fig. 18 se muestra el rango dinámico realizado para el ensayo de Navβ1.

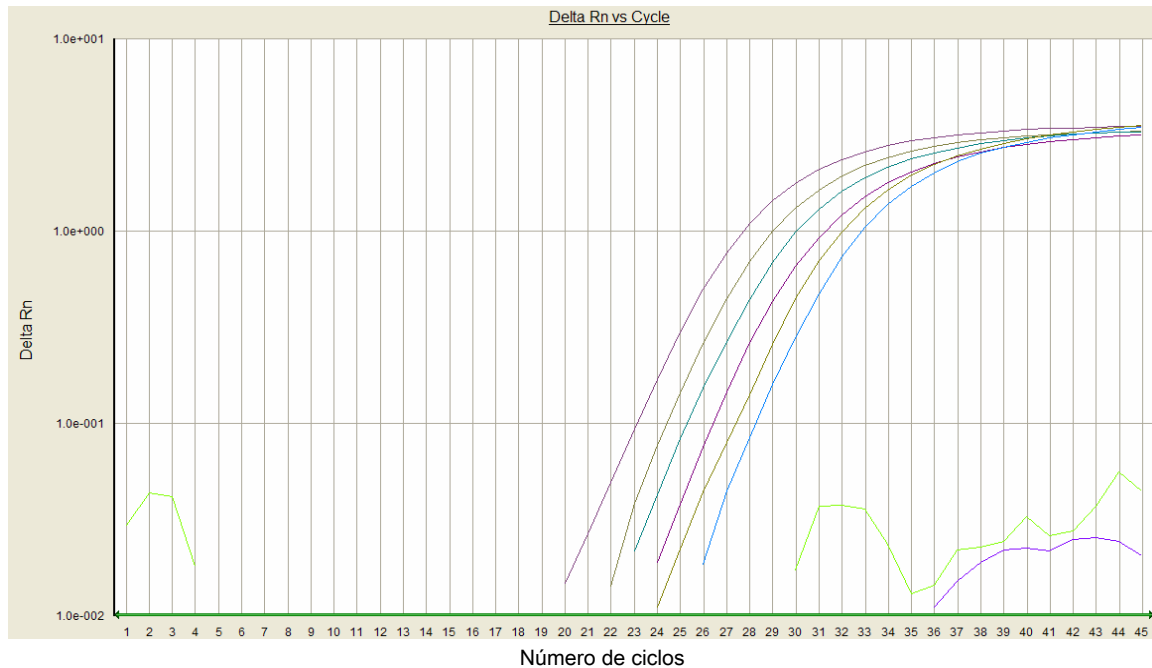


Figura 18. Rango dinámico para la subunidad $Na_v\beta 1$. Se prepararon diluciones seriales de cDNA y se determinó la expresión del gen en cada una de ellas, empleando el juego de *primers* y sonda específicos para su detección (ver Tabla 3). Las líneas de colores de la gráfica muestran la intensidad de la emisión neta de fluorescencia (Delta Rn; ver Apéndice A) en función del número de ciclos de la PCR. La diferencia en el número de ciclos entre cada curva de amplificación es de 1, debido a que cada dilución contenía la mitad de cDNA que la precedente. Con el fin de detectar también aquellos genes cuya expresión sea baja, el programa de amplificación consistió de 45 ciclos. Los controles negativos aparecen en el extremo inferior derecho del gráfico, indicando que sin la presencia del cDNA molde, no se puede llevar a cabo la reacción de PCR y sin ella, no es posible que haya un aumento de la fluorescencia.

En cada uno de los ensayos, una vez finalizada la reacción se fijó el *threshold cycle*, y se obtuvo el valor de C_T de cada reacción con ayuda del software del equipo. Se graficaron los valores de C_T en función del Log de la concentración de cDNA usada para cada reacción, se ajustaron los puntos por regresión lineal y se obtuvo el valor de la pendiente (Fig. 19) para sustituirlo en la ecuación que evalúa la eficiencia de la PCR y obtener la eficacia de cada ensayo. En la Tabla 6 se muestra el ejemplo para el caso de $Na_v\beta 1$.

En todos los casos la eficiencia de la reacción de PCR fue superior al 90%, y se decidió usar la dilución 1:4 del cDNA de cada muestra, para estudiar la expresión de los diez genes en cada una de ellas.

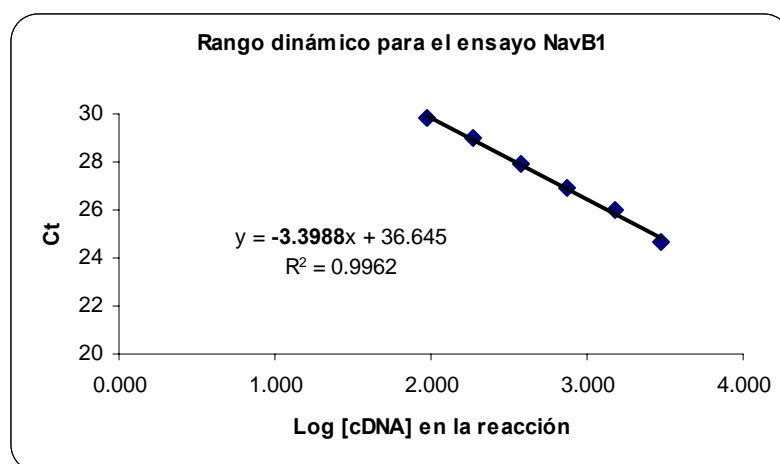


Figura 19. Análisis de los datos del rango dinámico para el ensayo de Navβ1. Se graficaron los valores de C_T en función de la concentración de cDNA inicial presente en la muestra (Fig. 18). Los puntos experimentales se ajustaron a una recta por regresión lineal, a partir de la cual se obtuvo el valor de la pendiente que en el gráfico se marca en negritas.

Dilución	[cDNA] (ng)	Log [cDNA]	C_T	Pendiente	Eficiencia de la PCR (%) ($E = 10^{(1/-S)} - 1$)
1:1	3000	3.477	24.67	-3.398	96.92
1:2	1500	3.176	25.98		
1:4	750	2.875	26.90		
1:8	375	2.574	27.95		
1:16	187.5	2.273	29.00		
1:32	93.75	1.972	29.81		
NTC	0	0	ND		

Tabla 6. Eficiencia de la reacción de PCR para el ensayo de Navβ1. Utilizando los datos de las Fig. 18 y 18 se calcularon los valores de Pendiente y Eficiencia de la PCR. NTC, control sin molde; ND, indeterminado.

La identidad de los amplicones generados por PCR en tiempo real se corroboró mediante secuenciación automática. Para lograr tal propósito, los productos de las reacciones de los rangos dinámicos fueron clonados en el vector pCR®8, amplificados en bacterias y posteriormente secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del IFC. En la Fig. 20 se muestra un ejemplo de la digestión con la enzima *EcoR* I de algunas de las clonas obtenidas como resultado de la ligación de dicho fragmento en el mencionado vector. Como se indicó en la sección de Métodos, la enzima *EcoR* I libera en su totalidad el

fragmento clonado. La secuencia de nucleótidos obtenida por la secuenciación posterior de una de estas clonas se compara con la reportada para la subunidad $Na_v1.1$ en el GenBank (Fig. 21).

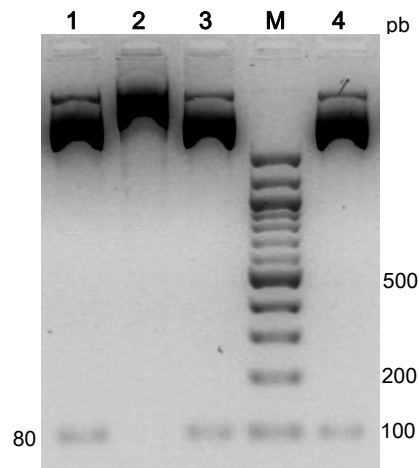


Figura 20. Liberación del fragmento clonado en el vector pCR[®]8. Digestión con *EcoR* I del DNA plasmídico de cuatro clonas (carriles 1, 2, 3 y 5), para liberar el fragmento de $Na_v1.1$ amplificado por PCR en Tiempo Real, y clonado en el vector pCR[®]8. Tres de las cuatro clonas analizadas presentaron el inserto de interés (banda de 80 pb). En este caso, la separación por electroforesis del inserto y del vector se realizó en un gel de agarosa al 2%. A la derecha se muestran algunos tamaños de banda del marcador de tamaño molecular (M) y a la izquierda el tamaño del amplicón esperado.

La identidad de cada uno de los fragmentos amplificados con los ensayos TaqMan se comprobó de la misma manera en que se describió para la subunidad $Na_v1.1$ y en todos los casos esta resultó positiva (datos no mostrados). A continuación se procedió a determinar la expresión relativa de cada gen en las distintas muestras de CaCu y de cervix no canceroso. Las reacciones fueron preparadas por triplicado de la misma forma descrita para el caso de los rangos dinámicos, se incluyeron los controles negativos correspondientes, y se sometieron al mismo programa de termociclado. Al finalizar la reacción se fijó un C_T común para todas las reacciones, y con ayuda del software del equipo, se obtuvieron los valores de C_T de cada una de ellas. Se obtuvo el promedio de cada triplicado, y se usó como valor unitario en los análisis posteriores. En la Fig. 22 se muestra el gráfico obtenido al llevar a cabo la reacción de PCR en Tiempo Real para el gen de $Na_v\beta1$ en las muestras de CaCu.

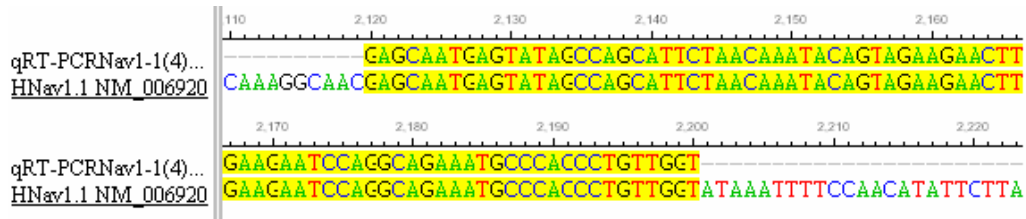


Figura 21. Alineamiento del fragmento de Nav1.1 amplificado por PCR en Tiempo Real. El alineamiento se realizó con la secuencia reportada en el GenBank (NM_006920). Se observó un 100% de identidad entre ambas secuencias.

Después de determinar la abundancia relativa del mensajero de cada una de las subunidades de canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a la TTX en las distintas muestras, se realizó un primer análisis de la expresión diferencial de cada gen, para lo cual se tomó como punto de comparación el número de C_T que cada uno de ellos presentó en las diferentes muestras. La abundancia relativa de cada una de las subunidades α y β en cada una de las muestras estudiadas se presenta en las Fig. 23 y 24, respectivamente.

En ambas figuras se gráfica el valor de C_T (media \pm desviación estándar), el cual es inversamente proporcional a la abundancia relativa del mRNA de cada gen en la muestra, por lo que valores pequeños de C_T refleja una mayor cantidad de mRNA y viceversa. Para una mejor apreciación, las muestras de CaCu (cultivos primarios y biopsias) se representan mediante barras negras y las muestras de biopsias de cervix no canceroso (controles) con barras grises.

Al observar cada una de las graficas, tanto las correspondientes a las subunidades α como a las β , se deduce que, con excepción de Nav1.1 (la cual presentó prácticamente los mismos niveles en ambos grupos de muestras), la abundancia relativa de todas las subunidades de canales de sodio es mayor en el CaCu que en el tejido no canceroso. Es importante mencionar, que aunque las diferencias en el tamaño de las barras se observen pequeñas, la diferencias son importantes, ya que la cantidad del número de copias del cDNA se duplica en cada ciclo de la reacción de PCR (de lo cual es indicativo el valor de C_T).

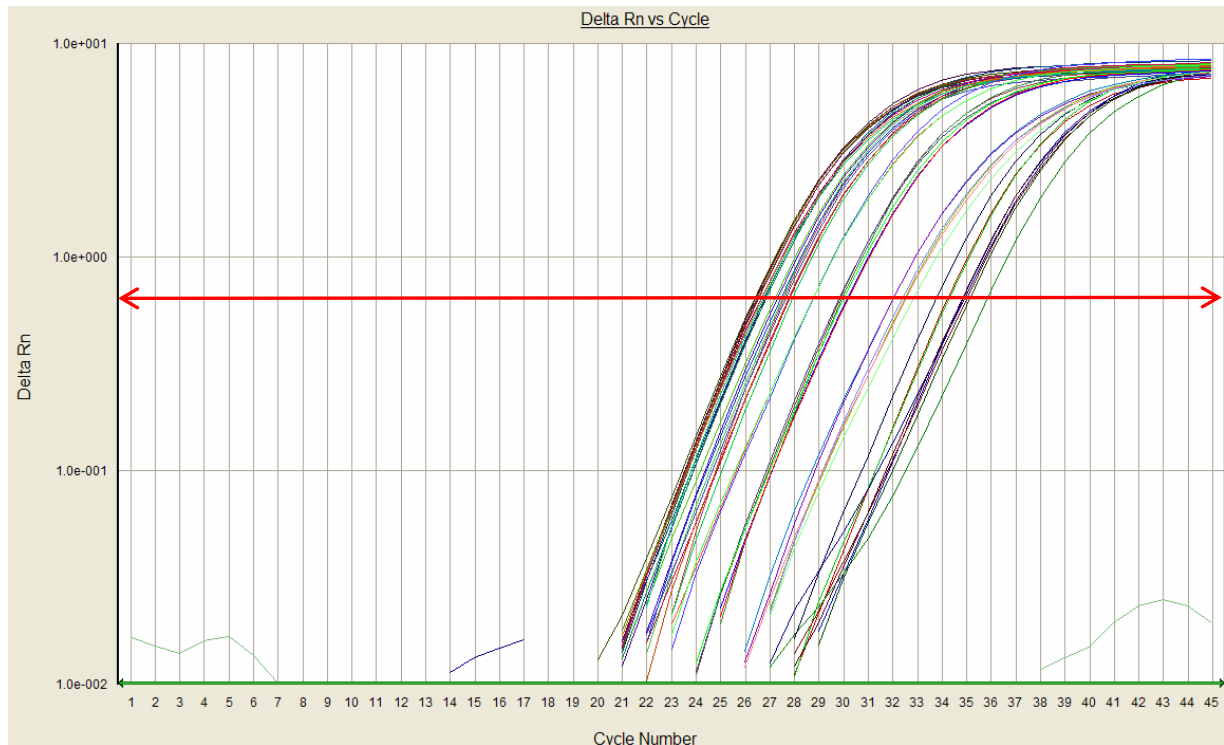


Figura 22. PCR en Tiempo Real para $Na_v\beta 2$ en las muestras de CaCu y de cervix no canceroso (Control). Las reacciones se prepararon por triplicado como se describe en el texto. Cada uno de los triplicados se observa como una línea de color continua, desde los niveles más bajos de la señal de fluorescencia (Delta Rn) hasta alcanzar una fase estacionaria (parte superior de la gráfica), conforme transcurre el número de ciclos de la PCR. Los controles negativos aparecen en el extremo inferior derecho del gráfico. La línea roja indica el umbral que el programa SDS 1.2.2 (Applied Biosystems) fijó automáticamente para determinar los valores de C_T de cada reacción.

Por el contrario, en el caso de $Na_v\beta 2$ y $Na_v\beta 4$, tres de las muestras de CaCu (barras 1, 2 y 3) presentaron una menor abundancia que las muestras Control (barras 10-14) y que las muestras de CaCu provenientes directamente de biopsias (barras 4 a 9). Las muestras 1, 2 y 3 son los cultivos primarios que hemos venido denominando JP, 085 y 354, mientras que las muestras 4 a 9 corresponden a biopsias de CaCu a las cuales se les extrajo directamente el RNA total para realizar los experimentos de PCR. Las implicaciones de estas observaciones se revisan en la sección de Discusión. No obstante, para facilitar la comparación respecto al grupo Control, en adelante se mencionará un solo grupo de muestras de CaCu (formado por las muestras de los cultivos primarios y las de biopsias).

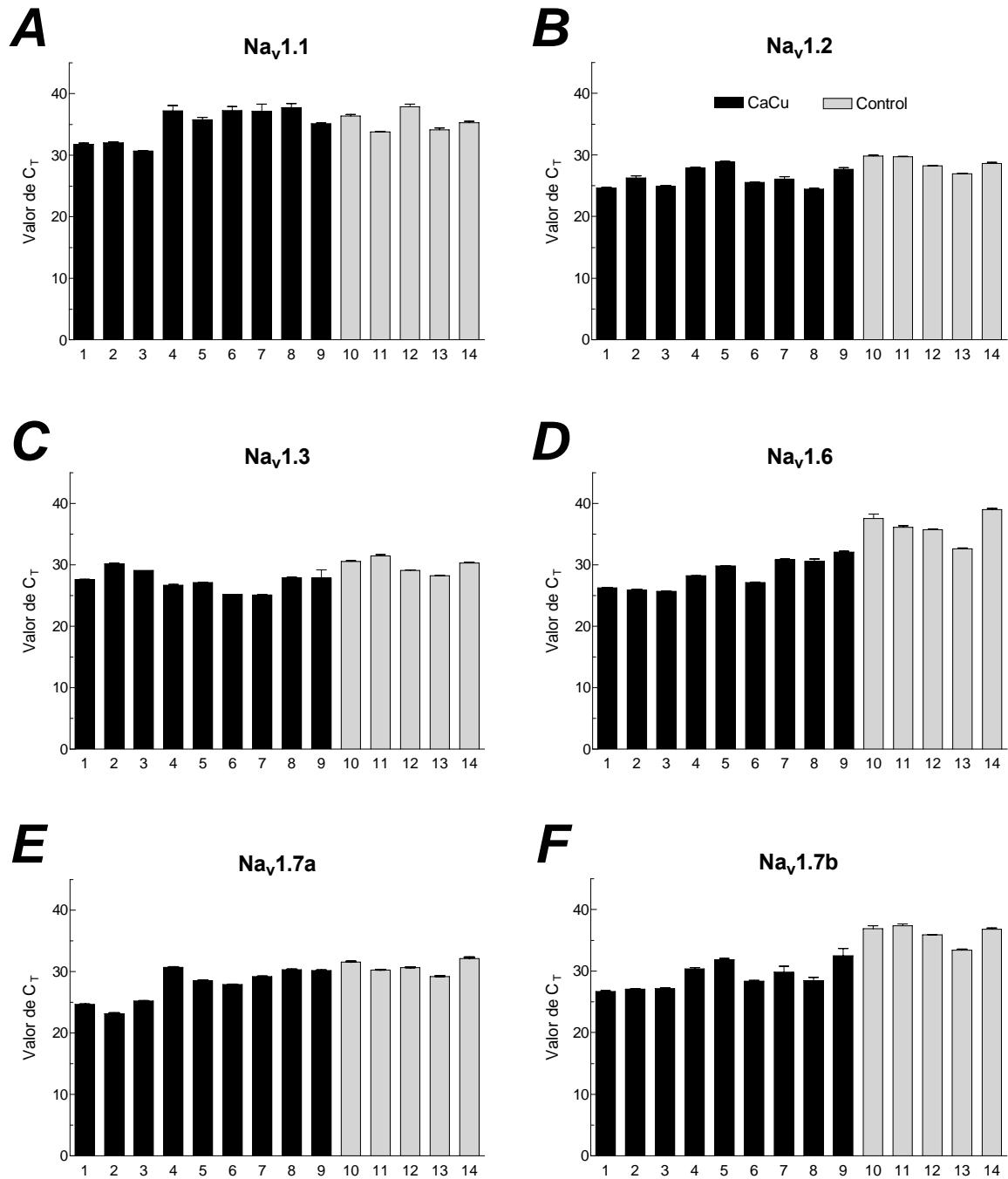


Figura 23. Niveles de expresión de las subunidades α de los canales de sodio expresadas en CaCu y cérvix no canceroso. En cada panel se gráfica el valor de C_T que cada gen presentó en las distintas muestras. El valor de C_T es inversamente proporcional a la abundancia relativa de cada gen. En cada panel las muestras 1, 2 y 3 corresponden a los cultivos primarios de CaCu denominados JP, 085 y 354; las muestras 4 a 9 son biopsias de CaCu y, las muestras 10 a 14 corresponden a biopsias de cervix no canceroso. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de observaciones por triplicado.

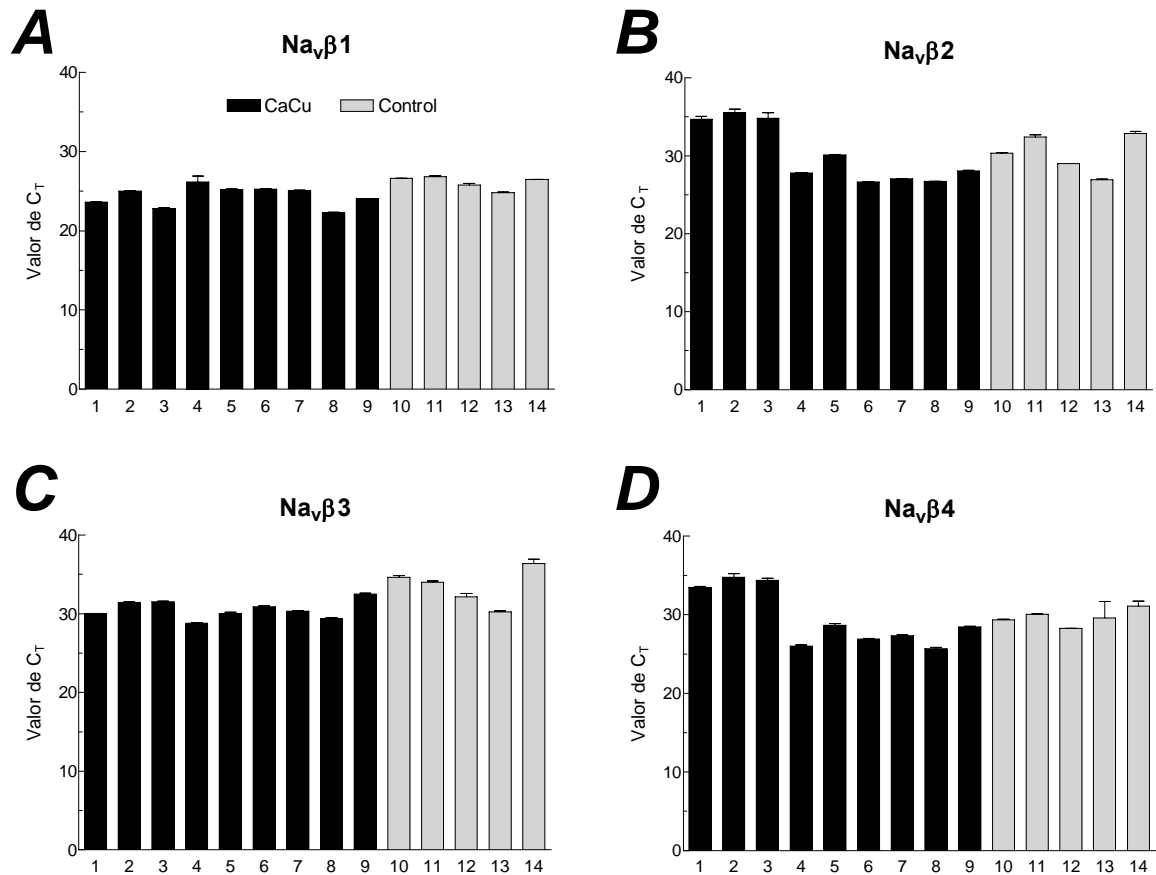


Figura 24. Niveles de expresión de las subunidades β de los canales de sodio expresadas en CaCu y cérvix no canceroso. Mismas muestras y condiciones que en la Fig. 23.

El siguiente paso fue comparar los niveles de expresión de cada gen entre las muestras de CaCu y las Control. Los resultados se presentan en la Fig. 25A. Los valores de C_T de las muestras de CaCu y Control fueron promediados y graficados en función de cada uno de los genes estudiados, incluyendo el de β -actina. Nuevamente, el tamaño de la barra es inversamente proporcional a la cantidad de mRNA de cada gen. Se puede observar que las subunidades $Na_v1.6$ y $Na_v1.7b$ tienen una mayor expresión en el CaCu con respecto al tejido no canceroso (Control). Las subunidades auxiliares $Na_v\beta1$ y $Na_v\beta3$ muestran también un incremento en su expresión en el CaCu, aunque dicho aumento es más discreto respecto al mostrado por las subunidades α mencionadas. En la Fig. 25A también se comparan los niveles de expresión de β -actina en ambos grupos experimentales, y de manera un tanto inesperada, los niveles de mRNA de dicha proteína se incrementan dramáticamente en el CaCu. Inicialmente, se había planeado utilizar la β -actina como un gen de referencia (control endógeno), sin embargo, como se puede apreciar con más detalle en la Fig. 25B, los niveles de expresión de β -actina no se mantienen constantes en todas las muestras, por el contrario, claramente se encuentran aumentados en el CaCu

respecto al grupo Control. Recientemente, se ha reportado que no todos los genes constitutivos mantienen un mismo nivel de expresión en situaciones de cáncer (de Kok et al., 2005; McNeill et al., 2007). No obstante, en líneas celulares derivadas de cáncer de próstata los niveles de β -actina, así como los de β 2 microglobulina y los de NADH citocromo b5 reductasa, se mantuvieron constantes en células con alta y baja capacidad metastásica (Diss et al., 2007). Por lo anterior, para los fines del presente trabajo de tesis se utilizó el gen de $\text{Na}_v1.1$ como gen normalizador, pues este presentó la menor dispersión de valores de C_T entre las muestras de CaCu y Control, es decir su expresión se mantiene relativamente constante en el tejido de cervix sano y en el canceroso (Fig. 25A).

Para cuantificar el aumento (o disminución) en la expresión de cada uno de los genes estudiados que se presenta en el CaCu se procedió a calcular la diferencia en los valores de C_T (ΔC_T) de cada gen entre las muestras de CaCu y las Control (cervix no canceroso), el cual se usó como el exponente de la base 2 para obtener el número de veces que varía la expresión de cada gen (Tabla 7: ver Apéndice). La columna de la extrema derecha de dicha tabla, muestra el número de veces que aumento la expresión de los genes referidos en las muestras de CaCu respecto del grupo Control. El mayor aumento lo presentaron las subunidades $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7b$, $\text{Na}_v1.7a$, $\text{Na}_v\beta 3$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v\beta 1$ (Fig. 26A y B), aunque claramente sobresalen las dos primeras, con aumentos de 210 y 99 veces respecto al Control.

Interesantemente, los niveles de expresión de la subunidad $\text{Na}_v1.1$ fueron muy semejantes entre ambos grupos de muestras (Fig. 23A y 25A), por lo que los valores de C_T de dicha subunidad se utilizaron como referencia para determinar la abundancia relativa del resto de los genes (Fig. 26C y D y Tabla 8). La normalización respecto a la subunidad $\text{Na}_v1.1$ indica claramente que las subunidades $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7b$ son las que tienen una mayor sobre expresión en el CaCu respecto al cervix no canceroso (Fig. 26C). En menor medida la subunidad $\text{Na}_v\beta 3$ mostró también un aumento considerable en el CaCu (Fig. 26D).

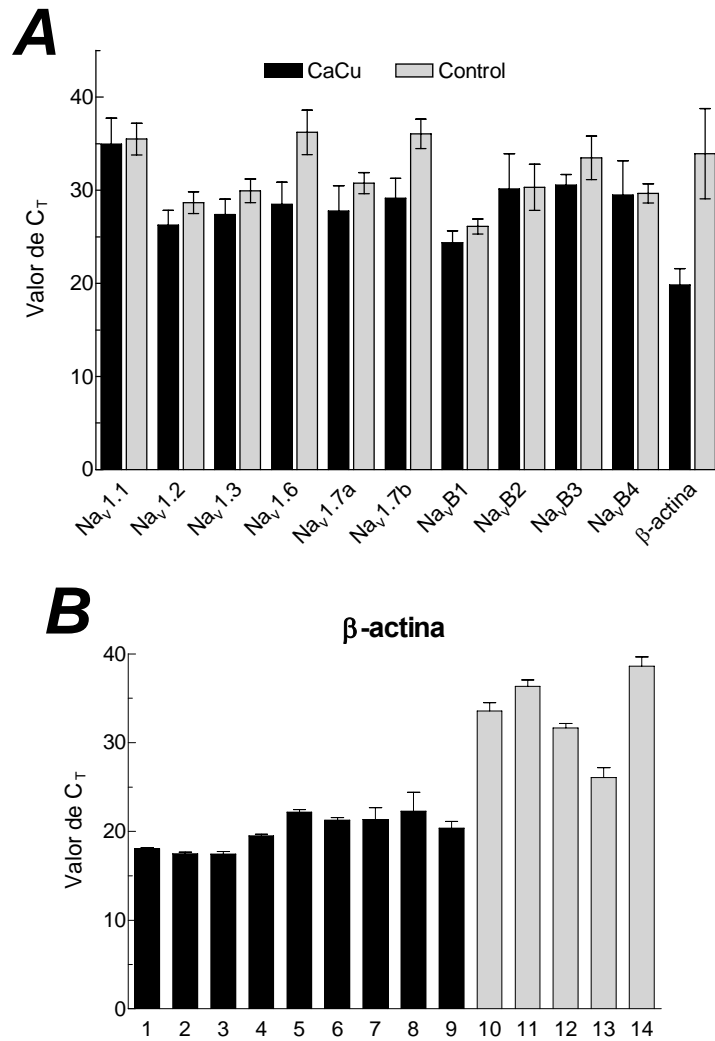


Figura 25. Expresión diferencial de canales de sodio y de β-actina en CaCu y cérvix no canceroso. **A**, Expresión diferencial de los genes indicados en el CaCu con respecto al cervix no canceroso. Se grafica el valor promedio ± desviación estándar del valor de C_T de cada gen para los grupos de muestras de CaCu y de cérvix no canceroso (Control). Nótese que las subunidades Na_v1.6 y Na_v1.7b se sobreexpresan de manera considerable en las muestras de CaCu. Inesperadamente, β-actina aumenta drásticamente su expresión en el CaCu. **B**, Niveles de expresión de β-actina en cada una de las muestras estudiadas. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar de seis observaciones en cada muestra.

Gen	C _T		ΔC _T (Control - CaCu)	Cambio en expresión (2 ^{ΔC_T})
	CaCu	Control		
Nav1.1	34.96	35.49	0.53	1.44
Nav1.2	26.26	28.66	2.40	5.29
Nav1.3	27.40	29.92	2.53	5.76
Nav1.6	28.48	36.20	7.72	210.77
Nav1.7a	27.74	30.74	3.00	8.02
Nav1.7b	29.41	36.05	6.64	99.46
Navβ1	24.36	26.10	1.74	3.33
Navβ2	30.14	30.30	0.16	1.12
Navβ3	30.54	33.47	2.93	7.62
Navβ4	29.50	29.66	0.15	1.11

Tabla 7. Determinación del cambio en la expresión de las subunidades de los canales de sodio en muestras de CaCu con respecto al cérvix no canceroso. Los valores de C_T son el promedio de los datos obtenidos a partir de todas las muestras de CaCu (muestras 1-9) y de Control (muestras 10-14), es decir, son los mismos datos que se grafican en la Fig. 25A. Los datos de la columna de la extrema derecha, representan el número de veces que aumento la cantidad de mRNA de cada uno de los genes en las muestras de CaCu respecto al grupo Control.

Finalmente, como se puede observar en la Fig. 24B y D, así como en la Fig. 25A y la Tabla 7, los resultados de PCR en Tiempo Real mostraron niveles semejantes del mRNA de las subunidades Navβ2 y Navβ4 en las muestras de CaCu y en las de Control, incluso en algunos casos siendo más abundante en muestras Control que en las muestras provenientes de los cultivos primarios de CaCu. Por el contrario, con los experimentos de RT-PCR estándar no se detectó ningún amplificado de dichas subunidades en las muestras Control (Fig. 15B). Con la finalidad de resolver esta aparente discrepancia entre nuestros resultados, se procedió a realizar una segunda serie de experimentos de RT-PCR estándar y de PCR en Tiempo Real de manera “simultánea” para determinar la expresión de los genes de Navβ2 y Navβ4 por las dos técnicas. Para tal propósito se usó cDNA de las cinco muestras Control que se utilizaron previamente para determinar la abundancia relativa de todos los genes por PCR en Tiempo Real. Es importante hacer notar que dichas muestras no son las mismas que se utilizaron para los experimentos de RT-PCR estándar de la Fig. 15B, pues el mRNA de las mismas se agotó con dichos experimentos. En el Apéndice B se presentan algunos datos de todas las muestras biológicas utilizadas en este trabajo de tesis.

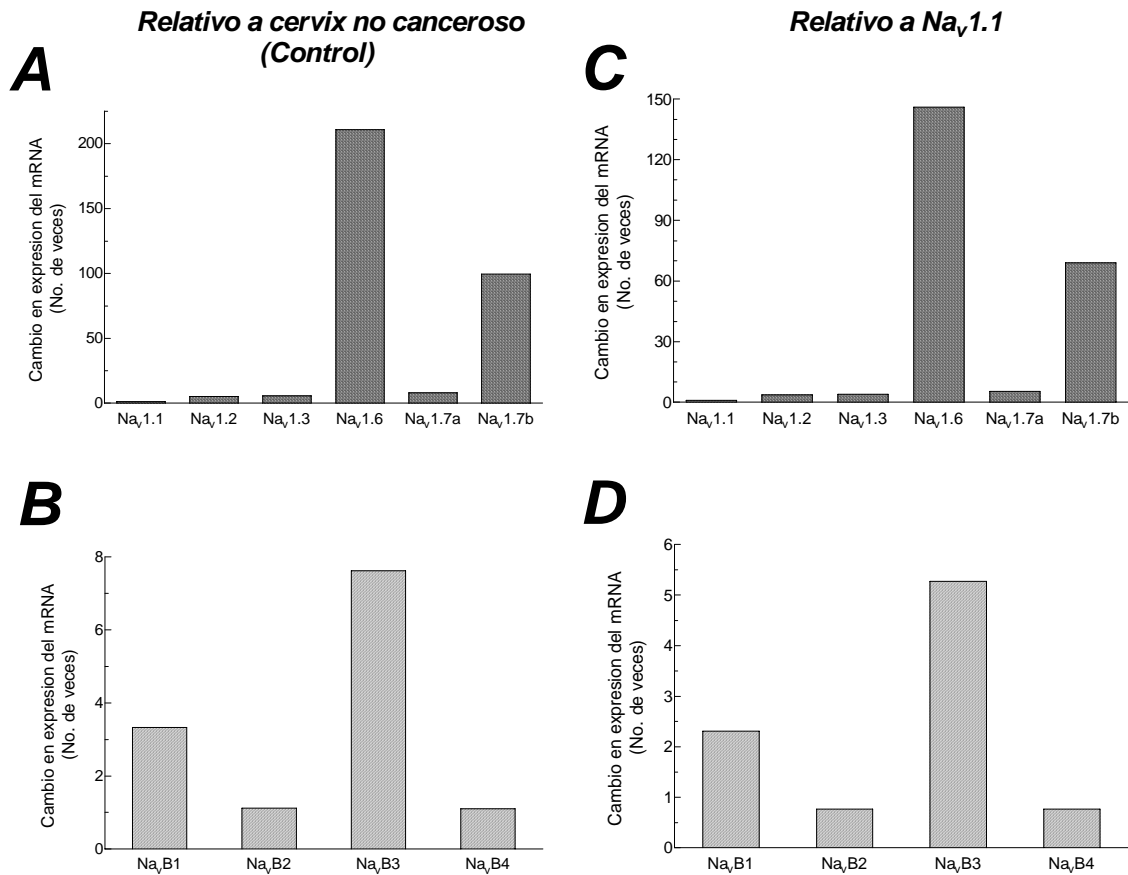


Figura 26. Abundancia relativa de las subunidades α de canales de sodio dependientes de voltaje en CaCu. Aumento de los niveles de mRNA (en número de veces) de las subunidades α (A) y β (B) en el CaCu respecto al cérvix no canceroso y respecto a los niveles de la subunidad $Na_v1.1$ (C y D, respectivamente). Los valores se obtuvieron como se describe en la Tabla 7 (A, B) y en la Tabla 8 (C, D). Se obtuvo la diferencia del valor de C_T que cada gen presentó entre los dos grupos de muestra, y se usó como exponencial de 2 para determinar la expresión diferencial de cada gen.

Para esta segunda serie de reacciones de RT-PCR estándar se utilizó la cantidad de cDNA equivalente a 250 ng de RNA, suponiendo una eficiencia del 100% en la reacción de transcripción inversa. El resto de los componentes de la reacción fue el mismo que en los experimentos de RT-PCR anteriormente descritos. Los resultados de dicho experimento mostraron que en una de las muestras estudiadas (la marcada con el número 13) se obtuvo un amplicón del tamaño esperado para ambas subunidades, aunque la intensidad de la banda fue muy baja (Fig. 27). En las otras cuatro muestras control no se detectó amplificación de ninguna de las dos subunidades bajo estudio.

Paralelamente, los experimentos de PCR en Tiempo Real arrojaron resultados prácticamente idénticos a los observados anteriormente para ambos genes en todas las

muestras. Lo anterior permite suponer que la expresión de $Na_v\beta 2$ y $Na_v\beta 4$ no puede ser detectada en las muestras de cérvix no canceroso mediante RT-PCR estándar debido a características específicas de la técnica, lo cual contrasta con la técnica de PCR en Tiempo Real que es significativamente más sensible.

Gen	C_T		ΔC_T Control	ΔC_T CaCu	$\Delta \Delta C_T$	Cambio en expresión ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
	Control	CaCu	Na_v interés - $Na_v1.1$	Na_v interés - $Na_v1.1$	ΔC_T CaCu - ΔC_T Control	
$Na_v1.1$	35.49	34.96	0.00	0.00	0.00	1.00
$Na_v1.2$	28.66	26.26	-6.83	-8.70	-1.87	3.66
$Na_v1.3$	29.92	27.40	-5.57	-7.56	-1.99	3.98
$Na_v1.6$	36.20	28.48	0.71	-6.48	-7.19	145.92
$Na_v1.7a$	30.74	27.74	-4.75	-7.22	-2.47	5.55
$Na_v1.7b$	36.05	29.41	0.55	-5.55	-6.10	68.83
$Na_v\beta 1$	26.10	24.36	-9.39	-10.60	-1.21	2.31
$Na_v\beta 2$	30.30	30.14	-5.19	-4.82	0.37	0.77
$Na_v\beta 3$	33.47	30.54	-2.02	-4.42	-2.40	5.27
$Na_v\beta 4$	29.66	29.50	-5.83	-5.46	0.38	0.77

Tabla 8. Determinación del cambio en expresión de las subunidades de los canales de sodio. La columna de la extrema derecha muestra el cambio en expresión en número de veces de cada gen en el CaCu con respecto al cérvix no canceroso. Los datos se obtuvieron por el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (ver Apéndice A) usando los valores de C_T de $Na_v1.1$ para la normalización.

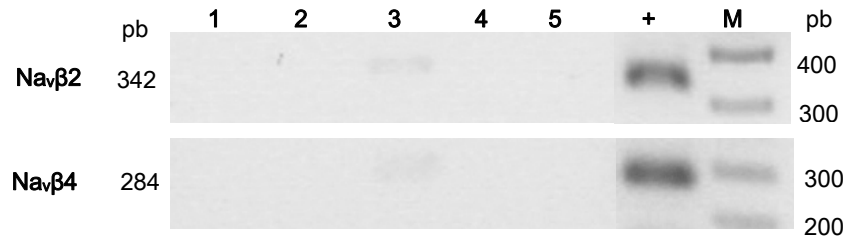


Figura 27. Resultados de la RT-PCR estándar para Navβ2 y Navβ4 en muestras de cérvix no canceroso. Se utilizó el cDNA equivalente a 250 ng de RNA para realizar cada reacción de la misma manera en que se hicieron todas las reacciones de RT-PCR anteriormente descritas. Los números sobre el gel indican el número de la muestra correspondiente con las muestras utilizadas en los experimentos de PCR en Tiempo Real. El control positivo (+) fue RNA de cerebro de humano. En el carril marcado con una M se separó el marcador de peso molecular de 100 pb.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se presentan resultados originales que indican un aumento en la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje en biopsias de cáncer cervicouterino con respecto al cervix no canceroso. Concretamente, los experimentos de RT-PCR en Tiempo Real mostraron la presencia de las subunidades α $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7a$, $Na_v1.7b$, así como las cuatro subunidades β reportadas hasta la fecha $Na_v\beta1$, $Na_v\beta2$, $Na_v\beta3$ y $Na_v\beta4$. Además, mediante la cuantificación relativa de cada uno de los genes mencionados, se encontró que las subunidades $Na_v1.6$ y $Na_v1.7b$ mostraron un incremento de 210 y 99 veces respecto a los niveles detectados en biopsias de tejido no canceroso. Las subunidades $Na_v1.7a$ y $Na_v\beta3$ también fueron sujetos de una mayor expresión en el CaCu, aunque a un menor grado (~ 8 veces). Estos últimos resultados representan el hallazgo más relevante de este estudio, pues sugiere que las subunidades $Na_v1.6$ y $Na_v1.7b$ pueden representar nuevos marcadores moleculares en el diagnóstico y posibles terapias para el tratamiento de este carcinoma. A continuación se discute con mayor detalle la relevancia e implicaciones de dichos resultados.

Expresión de subunidades α de canales de sodio sensibles a la TTX en el CaCu

Previamente, nuestro grupo de investigación había reportado la presencia de corrientes de sodio activadas por voltaje sensibles a la TTX en el CaCu, mismas que podrían ser conducidas a través de canales de sodio formados por las subunidades $Na_v1.2$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ (Diaz et al., 2007). Con los resultados de RT-PCR estándar presentados en este trabajo se completa el cuadro de subunidades de canales de sodio sensibles a la TTX, es decir, las subunidades $Na_v1.1$ y $Na_v1.3$ también se expresan en el CaCu (Fig. 11, 12 y 16). Interesantemente, la secuenciación de los fragmentos amplificados permitió detectar la expresión de distintas isoformas para ambos genes (Fig. 13, 14, y Tabla 5). En el caso de $Na_v1.1$ se detectaron las dos isoformas descritas en la literatura para este gen. Los números de acceso en el Gen Bank son AB093548 (isoforma 1) y NM_006920 (isoforma 2). La diferencia entre las isoformas consiste en la presencia de 33 nucleótidos adicionales (Fig. 14) que codifican para 11 aminoácidos más en la secuencia AB093548, y que se ubican en el asa intracelular que une los dominios I y II de la subunidad α del canal $Na_v1.1$ (Mulley et al., 2005). A la fecha no existen reportes en los que se haya investigado si las corrientes generadas por tales isoformas son diferentes.

Por su parte, la subunidad $Na_v1.3$ se puede expresar en tres diferentes isoformas reportadas en el GenBank, y los amplicones secuenciados demostraron la expresión de al menos dos isoformas distintas en uno de los cultivos primarios empleados en este estudio

(Tabla 5). La clona denominada CaCu 085-10 fue 100% idéntica a la secuencia reportada con el No. NM_006922, denominada aquí isoforma 1 (secuencia más larga). La secuencia de la clona 085-12 se caracterizó por tener 138 nucleótidos menos que la isoforma 1 (NM_006922), lo cual se refleja en una pérdida de 49 aminoácidos en la secuencia completa del canal. Esta secuencia presentó un 97.3% de similitud con la secuencia reportada en el GenBank para la isoforma 2 (NM_001081676). La diferencia consistió en que el fragmento amplificado en este trabajo contiene nueve nucleótidos más que la isoforma 2, mismos que codifican para tres aminoácidos extra en la misma asa intracelular del canal referido anteriormente. Uno de los tres aminoácidos en cuestión es una serina, lo cual es particularmente importante, debido a que este aminoácido es susceptible de fosforilación, y se ha demostrado que la presencia de dicho aminoácido en el asa I – II modifica las propiedades biofísicas del canal tales como la activación, la inactivación y la recuperación de la inactivación (Thimmapaya et al., 2005). La tercera clona de Na_v1.3 detectada fue la denominada CaCu 085-7, ésta presentó un 90.5% de similitud con la isoforma 1 y la diferencia se debió a la ausencia de 17 aminoácidos en el asa intracelular que une a los dominios I y II del canal. Debido a que no se encontró una secuencia en el GenBank que presente dicha variación en el gen de Na_v1.3, en este trabajo se denominó isoforma 3, a reserva de realizar más estudios para confirmar su existencia y en tal caso, caracterizar sus propiedades biofísicas.

Presencia de subunidades β de canales de sodio en el CaCu

Otro objetivo particular del presente trabajo fue el de investigar la presencia de las subunidades accesorias de los canales de sodio dependientes de voltaje, es decir, de las subunidades β . Mediante RT-PCR estándar también se encontró que las cuatro subunidades descritas a la fecha se expresan en el CaCu (Fig. 11, 15 y Tabla 5). En el caso de Na_v β 1 se detectó la misma secuencia reportada como la variante β 1A (NM_001037), caracterizada por representar el transcrito más largo de dos isoformas reportadas hasta el momento en el GenBank para este gen, y que codifica para una proteína con un peso molecular de 45 kDa, en comparación con los 36 kDa de la isoforma β 1 (Isom, 2001). Una secuencia considerablemente diferente se detectó en las células del cultivo CaCu JP a la cual denominamos aquí isoforma 2; el fragmento amplificado carece de 81 nucleótidos, lo que se traduciría en la ausencia de 27 aminoácidos, en caso de que se generara una proteína funcional. Por el momento no se ha reportado ninguna secuencia similar; por lo que no se desconoce si tal mRNA de lugar a una proteína funcional en algún tipo celular.

La secuenciación de los amplicones de $\text{Na}_v\beta_3$ reveló que en el CaCu se expresa la isoforma reportada en el GenBank con el número de acceso NM_004588, denominada variante 1. Hasta el momento han sido reportadas dos variantes de este gen originadas por procesamiento alternativo del mRNA, mismas que difieren en la región 5' no traducible, y que dan origen a la misma proteína. No existen reportes acerca de la expresión preferencial de alguna de las dos isoformas debida a esta diferencia, pero los resultados del presente estudio sugieren la existencia de mecanismos de transcripción que favorecen la expresión de la variante 1 en el tejido del cerviz uterino.

Los fragmentos amplificados de la subunidad $\text{Na}_v\beta_2$ a partir de los tres cultivos primarios de CaCu (muestras 1, 2, y 3) no correspondieron con la secuencia reportada en el GenBank (52.7% de similitud con la secuencia NM_004588). Sin embargo, la amplificación del mismo fragmento a partir del mRNA de biopsias de CaCu presentó una similitud del 100% con la secuencia NM_004588 (Fig. 17). La dificultad para clonar y así secuenciar el amplicón correcto de la subunidad $\text{Na}_v\beta_2$ a partir de los cultivos primarios, se puede atribuir a su menor expresión en dichas muestras, pues con la técnica de PCR en tiempo Real se demostró que las biopsias de CaCu expresaron cantidades mayores de dicha subunidad (Fig. 24B). De manera similar, la subunidad $\text{Na}_v\beta_4$, cuya secuencia amplificada fue 100% idéntica a la única isoforma reportada en el GenBank (NM_174934), también fue más abundante en las muestras de cultivos primarios que en aquellas de biopsias de CaCu (Fig. 24D). Estos resultados sugieren que las condiciones *in vitro* de los cultivos primarios promueve un patrón de expresión distinto para las subunidades $\text{Na}_v\beta_2$ y $\text{Na}_v\beta_4$, respecto a las biopsias de CaCu, mientras que en el resto de los genes estudiados, las muestras de los cultivos primarios y las biopsias de CaCu siguen la misma tendencia.

Possible función de las subunidades β de canales de sodio en el CaCu

Como ya se mencionó en la Introducción, además de su papel en la translocación de nuevos canales de sodio a la membrana plasmática y la modulación de sus propiedades biofísicas (Chen et al., 2004; McEwen et al., 2004; Schmidt et al., 1985), también se ha demostrado que las subunidades β pueden funcionar como moléculas de adhesión y migración celular independientemente del complejo formado con las subunidades α , mediante interacciones con la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular (Brackenbury et al., 2008; Isom et al., 1995; Malhotra et al., 2002; Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999). Tales efectos son conocidos por ser también de fundamental importancia para el proceso de metástasis (Okegawa et al., 2002), por ello es posible que una reducción en la expresión de dichas subunidades pueda ser asociada con una menor

adhesión celular o una mayor malignidad de las células; es decir que las células están en mejores condiciones para que se lleve a cabo la metástasis. Ahora bien, ¿por qué solo disminuye la expresión de $\text{Na}_v\beta 2$ y $\text{Na}_v\beta 4$? Esto podría deberse, al menos en parte, a que ambas subunidades comparten algunas características en común, presentan un mayor porcentaje de similitud entre ellas que con las subunidades $\text{Na}_v\beta 1$ y $\text{Na}_v\beta 3$ (Yu et al., 2003), se unen de manera covalente a la subunidad α (Catterall, 2000; Meadows & Isom, 2005), a diferencia de estas últimas dos que no interactúan de manera covalente con la subunidad formadora del poro. Por lo tanto, es probable que también compartan funciones específicas en su papel en la adhesión celular.

Por otro lado, a la fecha no existen reportes en los que se investigue específicamente el papel de la subunidad $\text{Na}_v\beta 2$ o $\text{Na}_v\beta 4$ en los procesos cancerosos, por lo que, para relacionar directamente los resultados de este trabajo con la biología del CaCu se requiere de otro tipo de experimentos. No obstante, en un trabajo muy reciente del grupo del Profesor Djamgoz del Colegio Imperial de Londres, se mostró que líneas celulares de cáncer de próstata altamente metastásicas presentaron 4.5 veces más mRNA de las cuatro subunidades β que líneas celulares con menor capacidad metastásica; dicho incremento fue debido mayoritariamente al aumento en los niveles de la subunidad $\text{Na}_v\beta 1$ (Diss et al., 2007). Interesantemente, la subunidad $\text{Na}_v\beta 2$ fue la que presentó los menores niveles de expresión en ambas líneas celulares (Diss et al., 2007).

La presencia de varias isoformas tanto de las subunidades α como de las β en el CaCu descritas en el presente estudio podrían ser el resultado de la desregulación de la maquinaria transcripcional característica de la biología del cáncer; lo que conlleva a la generación de múltiples mRNAs con modificaciones estructurales a lo largo de toda su secuencia. Dichos mRNAs podrían dar origen a múltiples isoformas proteínicas; sin embargo, el proceso de traducción demanda un alto gasto energético a la célula, y los mecanismos por los cuales se inicia dicho proceso están bien regulados. Se han descrito varios mecanismos asociados con el desarrollo y la progresión del cáncer, por los cuales las mutaciones en mRNAs específicos alteran la eficiencia de traducción. Uno de ellos es la presencia de una región 5' no traducible (5'UTR) larga. Se ha visto que conforme más grande es esta región en un mRNA, más ineficiente es su traducción, ya que se puede favorecer la formación de estructuras secundarias que interfieren con la unión de los factores de iniciación de la traducción (Mathews M., 2007). El segundo, y tal vez más importante, es la degradación de mRNAs mediada por la presencia de mutaciones sin sentido (también conocida como NMD). Esta vía se lleva a cabo en todas las células

eucariontes y asegura que los mRNAs que contienen mutaciones sin sentido no sean acumulados como sustratos de la maquinaria de traducción. Y de esta forma, la eliminación de tales transcritos previene la acumulación de fragmentos peptídicos potencialmente tóxicos para la célula (Perrin-Vidoz et al., 2002). Si todas las isoformas detectadas en el presente trabajo de tesis se traducen en proteínas funcionales, es algo que se deberá investigar en estudios posteriores.

Expresión diferencial de las subunidades de canales de sodio en el CaCu

En la segunda fase del presente trabajo, los experimentos de PCR en tiempo real permitieron observar que, a excepción de $Na_v\beta 2$ y $Na_v\beta 4$, todos los genes estudiados presentan una mayor expresión en el CaCu con respecto al cérvix no canceroso (Tabla 7). De manera sobresaliente $Na_v1.6$ y $Na_v1.7b$ fueron las dos subunidades α de los canales de sodio con mayores niveles de expresión con respecto al resto de las subunidades analizadas (Fig. 26A y C, Tablas 7 y 8). Este resultado es de suma importancia ya que permite sugerir que dichas subunidades podrían ser el sustrato molecular de las corrientes de sodio dependientes de voltaje observadas en los cultivos primarios de CaCu (Diaz et al., 2007). Para comprobar tal aseveración se tiene planeado realizar estudios farmacológicos utilizando una toxina (llamada Cn2) que recientemente se describió como selectiva para bloquear canales de sodio formados por la subunidad $Na_v1.6$ (de la Vega & Possani, 2007; Schiavon et al., 2006). Asimismo se tiene planeado realizar estudios funcionales de proliferación e invasividad con el uso de dicha toxina para investigar el papel de tales corrientes iónicas en la biología de este tipo de cáncer. Resultados preliminares generados en nuestro laboratorio indican que el bloqueo de la corriente de sodio con 6 μM de TTX, no altera la proliferación celular de los cultivos primarios de CaCu. La ausencia de efectos sobre la proliferación celular ya ha sido reportada para el caso del cáncer de mama (Roger et al., 2003) de próstata (Fraser et al., 1999) y de pulmón (Roger et al., 2007); de lo que se puede deducir que las corrientes de sodio en tales carcinomas no interfieren con el proceso de proliferación de las células cancerosas. Por el contrario, en los mismos tipos de cáncer (Fraser et al., 2005), se ha reportado que la actividad funcional de los canales de sodio esta directamente relacionada con algunas propiedades vinculadas al proceso de metástasis (Fraser et al., 1999; Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003; Roger et al., 2007).

La metástasis es un proceso complejo que comprende varios pasos, involucrando algunos tipos de comportamiento celular como la adhesión, secreción, interacción con la matriz extracelular (incluyendo la degradación enzimática), migración e invasión. Los canales de

sodio dependientes de voltaje pudieran estar involucrados en cualquiera de estas etapas, aún indirectamente, por ejemplo causando cambios en la expresión génica (Hahn & Covault, 1992), o alterando el ambiente intra o extracelular (Herzog et al., 2003; Powell et al., 1996). En el CaCu en particular, no existen reportes acerca del papel que pudieran desempeñar los canales de sodio, ni de ningún otro canal dependiente de voltaje, en los procesos de la metástasis; por lo que ésta pregunta deberá resolverse con el diseño de experimentos adicionales.

Por otra parte, la observación de que únicamente los niveles de mRNA de la subunidad $Na_v1.6$ aumentaron más de 200 veces en el CaCu respecto al cervix no canceroso, sin dejar de ser sorprendente, tiene sustento en resultados similares descritos en otros tipos de cáncer. En el cáncer de próstata se ha reportado que el mRNA de la subunidad $Na_v1.7$ es 20 veces más abundante en líneas celulares altamente metastásicas y en biopsias de cáncer de próstata en comparación con el tejido no canceroso y líneas celulares menos agresivas desde el punto de vista metastásico (Diss et al., 2005; Diss et al., 2007). En la misma dirección, en el cáncer de mama se ha documentado un incremento de hasta mil veces en la expresión del mensajero de la subunidad $Na_v1.5$ en células altamente metastásicas respecto al mostrado con las menos metastásicas (Fraser et al., 2005). En ambos tipos de cáncer se ha demostrado la relevancia de los canales de sodio dependientes de voltaje formados por las subunidades mencionadas en el proceso de metástasis del carcinoma respectivo (Brackenbury et al., 2007; Diss et al., 2005; Fraser et al., 2005); esos mismos trabajos han propuesto a los canales de sodio como potenciales marcadores moleculares de estos tipos de cáncer. Por lo anterior, los resultados presentados en el presente trabajo de tesis podrían significar una nueva herramienta en la identificación del CaCu y posiblemente en la terapia anticancerígena, utilizando a la subunidad $Na_v1.6$ como un marcador molecular y blanco terapéutico de este tipo de cáncer.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La subunidad $Na_v1.6$ de los canales de sodio dependientes de voltaje es la más abundante en el CaCu, respecto al tejido de cervix no canceroso. Le siguen en orden descendente las subunidades $Na_v1.7b$ y $Na_v\beta3$. Es probable que la combinación de dichas subunidades de lugar a los canales de sodio que transportan las corrientes iónicas de sodio presentes en células de los cultivos primarios de este tipo de cáncer. Sin embargo, para establecer contundentemente una relación entre ambos resultados se requieren experimentos farmacológicos y funcionales adicionales. Asimismo, se requiere comprobar la expresión a nivel de proteína de dicho gen *in vivo* (en el tejido canceroso). A reserva de demostrar tal relación, la abundancia mostrada por la subunidad $Na_v1.6$ permite proponer a este gen como un posible marcador molecular de CaCu

Adicionalmente, la isoforma $Na_v1.7b$ detectada a nivel de mRNA en las muestras de CaCu y Control que no se ha reportado previamente en humano deberá ser clonada para confirmar su identidad, así como para caracterizar sus propiedades biofísicas y farmacológicas. En cuanto a las subunidades accesorias β , en particular $Na_v\beta3$ habrá que determinar su papel en las propiedades de invasividad del CaCu.

APENDICE A

PCR estándar y PCR en Tiempo Real

La RT-PCR (transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) es actualmente la técnica más sensible para la detección y cuantificación del mRNA. Comparada con otras técnicas usadas comúnmente para la cuantificación de los niveles de mRNA tales como el *Northern blot* y el ensayo de protección de la RNasa, la RT-PCR puede usarse para cuantificar niveles de mRNA de muestras mucho más pequeñas. De hecho, esta técnica es lo suficientemente sensible para cuantificar los niveles de mRNA de una sola célula. Sin embargo, a pesar de los grandes avances hechos a las químicas e instrumentos para la detección de amplicones por PCR en Tiempo Real, la RT-PCR estándar (también llamada de punto final) permanece como una técnica comúnmente usada para la medición de cambios de la expresión génica en un número pequeño de muestras basándose en la detección de un colorante fluorescente como el bromuro de etidio, el marcaje con ^{32}P y la ayuda de un visualizador especial que permite la cuantificación de producto por medio de la densidad óptica.

Sin embargo, la PCR en Tiempo Real presenta varias ventajas respecto a la PCR estándar. Entre ellas está la tinción post-corrída requerida por parte de la PCR estándar con bromuro de etidio para identificar los amplicones por electroforesis en geles de agarosa. El diseño de oligonucleótidos marcados con moléculas fluorogénicas (Livak et al., 1995), permitió el monitoreo de la amplificación de un fragmento específico de DNA en cada ciclo de la reacción de PCR. A partir de entonces, se han desarrollado nuevas químicas y plataformas de instrumentación que permiten la detección de productos de PCR en Tiempo Real, y es así como esta versión de la RT-PCR se ha convertido en el principal método para cuantificar los cambios en la expresión génica.

Para apreciar las ventajas de la PCR en Tiempo Real, es útil comentar algunas generalidades de la PCR. Al inicio de una reacción de PCR, los reactivos se encuentran en exceso, el DNA molde y el producto mismo están en concentraciones lo suficientemente bajas para que el producto no compita con la unión de los *primers*, y el proceso de amplificación sea constante a una velocidad exponencial o geométrica. El punto en el cual la velocidad de la reacción deja de ser exponencial y entra a una fase lineal es bastante variable, incluso aún entre replicas de una misma muestra; pero aparentemente la causa principal de que se presente este fenómeno es el producto compite con la unión de los *primers*. Algunos ciclos después de que esto suceda, la

velocidad de amplificación cae casi hasta cero, fase conocida como *plateau* en donde puede haber pequeños cambios en la cantidad de producto, pero lo más usual es que se presente como una etapa estacionaria (Fig. A1).

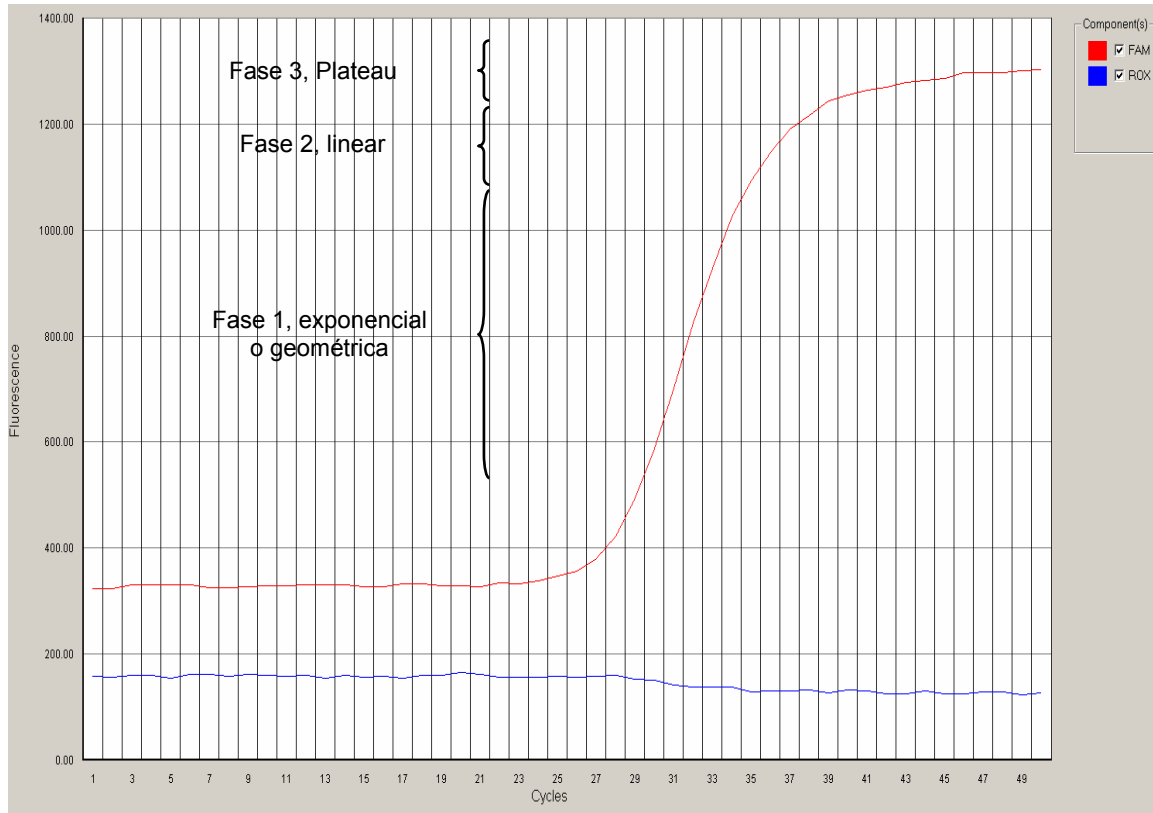


Figura A1. Fases de la reacción de PCR. Se ilustra el aumento en la señal de fluorescencia en función del número de ciclos de la reacción de PCR (línea roja). Se indican cada una de las fases de la reacción. La curva se obtuvo en un experimento PCR en Tiempo Real para amplificar un fragmento de la subunidad Na_v. La línea azul representa un fluoróforo distinto presente en la muestra, útil para normalizar la señal debida a la amplificación.

En la PCR en Tiempo Real no se requiere de manipulación después de la reacción, ya que los resultados son disponibles en cuanto esta termina; además se disminuye la variabilidad, debido a que los datos son obtenidos durante la fase exponencial de la reacción, de manera que los datos no son influenciados por la saturación a la que llega la reacción. Se tiene así un ensayo altamente específico y sensible.

Para una cuantificación segura y precisa, es necesario colectar los datos en un punto en el cual cada muestra esté en la fase de amplificación exponencial, ya que solamente en esta fase la amplificación es reproducible. La PCR en tiempo real automatiza este proceso cuantificando los productos en cada ciclo de la reacción y en cada una de las muestras. Esto genera un rango dinámico que abarca diluciones de una muestra de hasta 10^7 (una en diez millones). Es decir, la posibilidad de discernir cuantitativamente las diferencias en

la expresión de distintos genes, cuya abundancia relativa puede diferir en varios órdenes de magnitud.

Químicas de la PCR en Tiempo Real

Existen cuatro químicas diferentes disponibles para la técnica de PCR en tiempo real: TaqMan (Applied Biosystems), Molecular Beacons, Scorpions® y SYBR® Green (Molecular Probes). Todas estas químicas permiten la detección de productos de PCR por medio de la generación de una señal fluorescente. Las sondas TaqMan, Molecular Beacons y Scorpions dependen de la transferencia de energía por resonancia Förster (FRET) para generar la señal de fluorescencia, por medio del acoplamiento de una molécula fluorogénica y un apagador o *quencher* en el mismo, o en un oligonucleótido diferente. SYBR Green es una molécula fluorogénica que emite un poco de fluorescencia cuando se encuentra en solución, pero que emite una fuerte señal fluorescente cuando se une a una doble hebra de DNA. En el presente estudio se utilizaron sondas TaqMan para realizar la PCR en Tiempo Real, pues es la que se considera más adecuada para cuantificar la expresión de uno o varios genes.

Sondas TaqMan

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que tienen una molécula reportera fluorescente unida a su extremo 5' y un apagador acoplado al extremo 3'. Las sondas están diseñadas para hibridar en una región interna del producto de PCR flanqueado por los *primers* sentido y antisentido, y mientras la sonda esté intacta en el estado hibridado, la proximidad del fluoróforo y el apagador previene la detección de la señal de fluorescencia proveniente de la sonda. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR, cuando la polimerasa replica un molde sobre el que una sonda TaqMan está unida, la actividad de exonucleasa en sentido 5' – 3' de la polimerasa hidroliza a la sonda. Esto desacopla al fluoróforo y al apagador, por lo que el FRET deja de ocurrir. De esta manera, la fluorescencia incrementa con cada ciclo proporcionalmente a la cantidad de sonda fragmentada. La sonda tiene una T_m (temperatura de *melting* o de separación de hebras) aproximadamente 10°C superior a la T_m de los primers, logrando con ello una amplificación de fragmentos mucho más específica.

La cantidad de fluorescencia liberada es directamente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo de la reacción de PCR; por lo que se puede utilizar como medida cuantitativa de la formación del producto. Este proceso, que tiene lugar en cada ciclo de la reacción de PCR, no interfiere con la acumulación exponencial del producto de

PCR, y el incremento de fluorescencia puede ser leído en tiempo real (durante el transcurso de la reacción) por un detector. Un programa de computación acoplado al detector calcula el valor específico de emisión de fluorescencia (ΔR_n), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

En donde R_n^+ es la emisión de fluorescencia del producto en cada punto, y R_n^- es la emisión de fluorescencia basal. Este valor expresa la degradación de la sonda durante el proceso de la reacción de PCR. El mismo programa construye gráficas de amplificación utilizando los datos de emisión de fluorescencia obtenidos durante la amplificación (como las ilustradas en las Fig. A1 y A2). Los ΔR_n se grafican respecto al número de ciclos de la reacción. Durante los primeros ciclos los valores de ΔR_n no sobrepasan la línea basal (Fig. A2). Se designa un umbral arbitrario (*threshold*) sobre la fase exponencial de la gráfica, normalmente determinado como 10 veces la desviación estándar de la línea basal. Es importante mencionar que la designación de dicho umbral puede ser manual o el programa puede hacerlo de manera automática; para evitar errores de apreciación del experimentador, en el presente estudio dicho umbral fue determinado utilizando la opción de Automático del programa contenido en el equipo de detección (SDS 1.2.2 de Applied Biosystems). El ciclo umbral (*threshold cycle* o C_T) se calcula como el punto (número de ciclo) en el cual la fluorescencia excede el umbral así designado (Fig. A2). Los valores de C_T disminuyen linealmente con el incremento de la cantidad del transcrito de interés presente en la muestra.

La alta especificidad de este método se debe a la complementariedad entre los *primers*, la sonda interna y el amplicón de interés. La señal de fluorescencia se generará solamente si la sonda se alinea con la secuencia diana durante la reacción de PCR. La reacción de PCR en Tiempo Real incluye, además de la sonda TaqMan, todos los componentes de una reacción de PCR estándar, es decir, los cuatro nucleótidos en un *buffer* óptimo que contiene la concentración ideal de magnesio, la DNA polimerasa y el par de *primers* correspondiente.

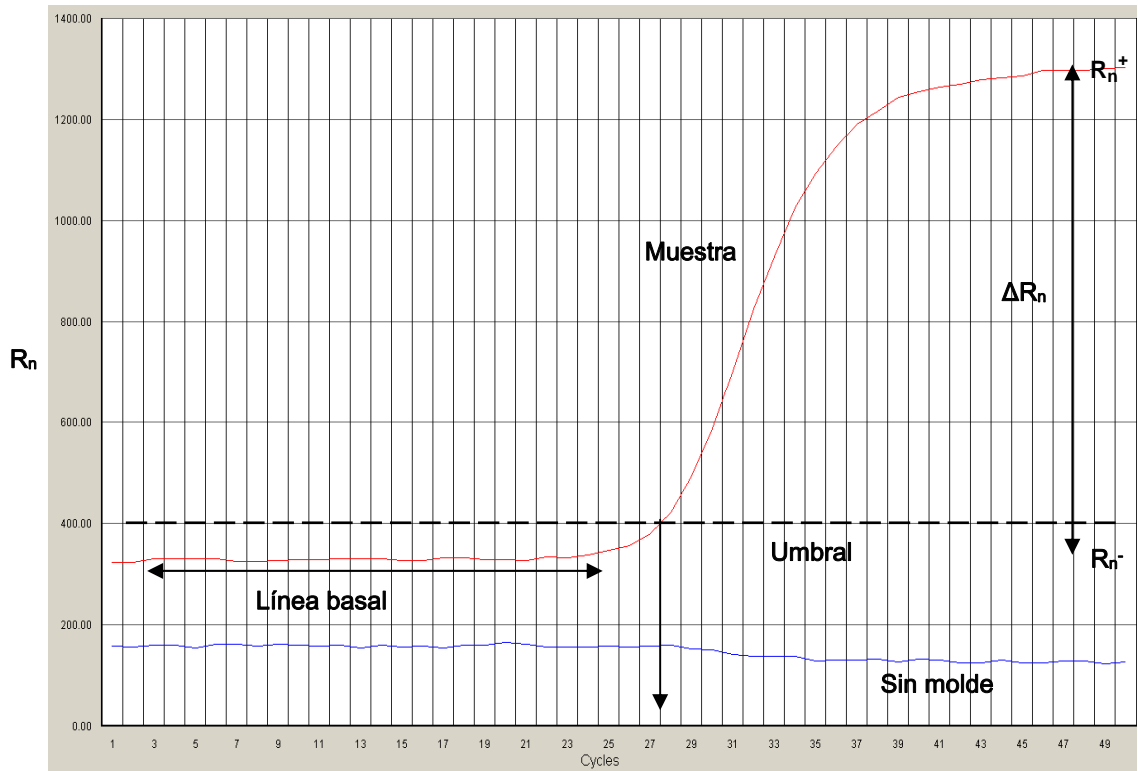


Figura A2. Gráfica de amplificación de la reacción de PCR en tiempo real. R_n^+ : emisión de fluorescencia del producto en cada punto; R_n^- : emisión de fluorescencia de la línea basal; C_T : *threshold cycle*, ciclo umbral.

Cuantificación de resultados

Comúnmente se usan dos estrategias para cuantificar los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real: el método de la curva estándar y el método comparativo de ciclo umbral. A continuación se describe en detalle este último, pues es el que se emplea en el presente estudio.

Método comparativo de C_T

Este método involucra la comparación de valores de C_T de las muestras de interés con un control o calibrador, tal como una muestra no tratada o RNA proveniente de un tejido normal. Los valores de C_T tanto del calibrador como de las muestras de interés son normalizados a un gen constitutivo endógeno apropiado. El método comparativo de C_T es conocido también como el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001) donde el exponente de dicha expresión se obtiene de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ muestra}} - \Delta C_{T \text{ referencia}}$$

Aquí, ΔC_T *muestra* es el valor de C_T para cualquier muestra normalizada con el gen constitutivo endógeno, y ΔC_T *referencia* es el valor de C_T para el calibrador, también normalizado con el gen constitutivo endógeno. Para que la aplicación del método del $\Delta\Delta C_T$ sea válida, las eficiencias de la reacción de PCR del gen de interés y de la referencia endógena deben ser aproximadamente iguales. Esto puede establecerse observando como varía el valor de C_T con respecto a la concentración inicial de molde.

La cuantificación relativa compara la abundancia del transcrito de interés a través de distintas muestras, usando la amplificación de un control interno para la normalización de la muestra. Los resultados son expresados como la proporción de la señal del gen específico y la señal del control interno. Esto produce un valor relativo corregido para el producto del gen específico en cada muestra. Estos valores pueden ser comparados entre muestras para dar un estimado de la expresión relativa del RNA blanco en las distintas muestras; por ejemplo, 2.5 veces más $Na_v1.1$ en la muestra 1 que en la muestra 2.

La RT-PCR relativa usa *primers* para un control interno y para un gen de interés. La expresión del control interno debe ser constante en todas las muestras que serán analizadas. Entonces la señal del control interno puede ser usada para normalizar los datos de la muestra para cuantificar las diferencias de tubo a tubo causadas por la variación de la calidad del RNA o la eficiencia de la RT, la cuantificación inexacta o el pipeteo. Los controles internos pueden ser los mRNA de β -actina, GAPDH, 18s y otros.

APENDICE B

Información de pacientes cuyas biopsias fueron estudiadas en el presente estudio

Las muestras de CaCu fueron obtenidas de biopsias positivas para el virus de papiloma humano (VPH) tipo 16. Excepto por una de ellas, todas las muestras fueron de cáncer tipo epidermoide. La excepción fue un adenocarcinoma (cultivo primario 354). La clasificación se hizo en base al sistema FIGO, y fue llevado a cabo por la Unidad de Oncología del Hospital General de México. Las muestras control fueron obtenidas a partir de histerectomías realizadas a pacientes diagnosticadas en la mayoría de los casos con miomatosis. Todas ellas fueron negativas a VPH 16. A continuación se especifican algunas características de cada paciente:

Para PCR estándar

Nombre	Muestra	Información
<i>Cultivos primarios</i>		
JP	JP	Cáncer epidermoide IIA.
085	085	Cáncer epidermoide IIIB.
354	354	Adenocarcinoma IIB.
<i>Biopsias CaCu</i>		
R158	1	Edad: 37 años; Cáncer epidermoide IVB.
R198	2	Edad: 50 años; Cáncer epidermoide IIIB.
R72	3	Edad: 61 años; Cáncer epidermoide IB1.
R80	4	Edad: 60 años; Cáncer epidermoide IIB.
R95	5	Edad: 65 años, Cáncer epidermoide IIB.
R154	6	Edad: 42 años, Cáncer epidermoide IIIB
<i>Biopsias Control (cervix no canceroso)</i>		
A2	1	Edad: 36 años; Adenomiosis.
A3	2	Edad: 33 años; Miomatosis.
A4	3	Edad: 51 años; Proceso inflamatorio, Quistes que protruyen hacia la luz cervical. Hiperplasia endometrial.
A5	4	Edad: 75 años; Prolapso genital.
A8	5	Edad: 50 años; Miomatosis.
A9	6	Edad: 63 años; Prolapso genital.

Para PCR en Tiempo Real

Nombre	Muestra	Información
<i>Cultivos primarios</i>		
JP	1	Cáncer epidermoide IIA.
085	2	Cáncer epidermoide IIIB.
354	3	Adenocarcinoma IIB.
<i>Biopsias CaCu</i>		
R194	4	Edad: 64 años; Cáncer epidermoide IB1.
R154	5	Edad: 42 años; Cáncer epidermoide IIIB.
R262	6	Edad: 54 años; Cáncer epidermoide IIB; Tipo de tumor: invasor,
R265	7	Edad: 46 años, Cáncer epidermoide IB; Tipo de tumor: invasor,
R268	8	Edad: 34 años; Cáncer epidermoide IIB; Tipo de tumor: pre-invasor, no presenta queratinización.
R324	9	Edad: 28 años; Cáncer epidermoide IB2; Tipo de tumor: invasor, poco diferenciado, no presenta queratinización.
<i>Biopsias Control (cervix no canceroso)</i>		
CCN6	10	Edad: 38 años; Patología: normal, Inflamación: leve. Miomatosis. Exocervix.
CCN10	11	Edad: 39 años; Patología: normal, Inflamación: nula. Miomatosis. Endocervix.
EXO10	12	Edad: 39 años; Patología: normal, Inflamación: nula. Miomatosis. Exocervix.
ENDO13	13	Edad: 46 años; Patología: normal, Inflamación: nula. Miomatosis. Endocervix
CCN19	14	Edad: 37 años; Patología: metaplasia, Inflamación: moderada. Miomatosis. Endocervix.

BIBLIOGRAFIA

- Arias-Pulido, H., Peyton, C.L., Joste, N.E., Vargas, H., & Wheeler, C.M. 2006. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 44:1755-1762.
- Brackenbury, W.J., Chioni, A.M., Diss, J.K., & Djamgoz, M.B. 2007. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101:149-160.
- Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B., & Isom, L.L. 2008. An Emerging Role for Voltage-Gated Na⁺ Channels in Cellular Migration: Regulation of Central Nervous System Development and Potentiation of Invasive Cancers. *Neuroscientist*.
- Burchell, A.N., Winer, R.L., de Sanjose, S., & Franco, E.L. 2006. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3-52-S3/61.
- Bustin, S.A., Li, S.R., & Dorudi, S. 2001. Expression of the Ca²⁺-activated chloride channel genes CLCA1 and CLCA2 is downregulated in human colorectal cancer. *DNA Cell Biol* 20:331-338.
- Catterall, W.A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Catterall, W.A. 2002. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. *Novartis Found Symp* 241:206-218.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G. 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* 55:575-578.
- Chen, C., Westenbroek, R.E., Xu, X., Edwards, C.A., Sorenson, D.R., Chen, Y., McEwen, D.P., O'Malley, H.A., Bharucha, V., Meadows, L.S., Knudsen, G.A., Vilaythong, A., Noebels, J.L., Saunders, T.L., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W.A., & Isom, L.L. 2004. Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24:4030-4042.
- Clapham, D.E. 2002. Sorting out MIC, TRP, and CRAC ion channels. *J Gen Physiol* 120:217-220.
- Crociani, O., Guasti, L., Balzi, M., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., Wymore, R.S., & Arcangeli, A. 2003. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* 278:2947-2955.
- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W., & Span, P.N. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85:154-159.
- de la Vega, R.C. & Possani, L.D. 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49:171-180.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., & zur, H.H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Deutsch, C. & Chen, L.Q. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10036-10040.
- Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernandez-Gallegos, E., Ramirez-Dominguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S., Berumen, J., Camacho, J., & Gomora, J.C. 2007. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 210:469-478.
- Ding, Y., Brackenbury, W.J., Onganer, P.U., Montano, X., Porter, L.M., Bates, L.F., & Djamgoz, M.B. 2008. Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Physiol* 215:77-81.
- Ding, Y. & Djamgoz, M.B. 2004. Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na⁺ current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1249-1260.

- Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.** 2001. Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate* 48:165-178.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.** 2004. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys J* 33:180-193.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., & Djamgoz, M.B.** 2007. beta-Subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*
- Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., & Djamgoz, M.B.** 2005. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8:266-273.
- Doorbar, J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525-541.
- Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dzul-Rosado, K., Puerto-Solis, M., & and González-Losa, M.R.** 2004. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed* 15:233-241.
- Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L.M., Lara, G., Villanueva, L.A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L.A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sanchez-Pena, C., & Camacho, J.** 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 64:6996-7001.
- Fraser, S.P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C.S., & Djamgoz, M.B.** 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res* 295:505-512.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., & Djamgoz, M.B.** 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11:5381-5389.
- Fraser, S.P. & Pardo, L.A.** 2008. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Rep* 9:512-515.
- Fraser, S.P., Salvador, V., Manning, E.A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R.J., & Djamgoz, M.B.** 2003. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* 195:479-487.
- Goldin, A.L.** 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63:871-894.
- Grimes, J.A. & Djamgoz, M.B.** 1998. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* 175:50-58.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., & Djamgoz, M.B.** 1995. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 369:290-294.
- Gruber, A.D. & Pauli, B.U.** 1999. Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res* 59:5488-5491.
- Hahn, C.G. & Covault, J.** 1992. Neural regulation of N-cadherin gene expression in developing and adult skeletal muscle. *J Neurosci* 12:4677-4687.

- Haverstick, D.M., Heady, T.N., Macdonald, T.L., & Gray, L.S. 2000. Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry. *Cancer Res* 60:1002-1008.
- Herrero, R., Castle, P.E., Schiffman, M., Bratti, M.C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Sherman, M.E., Wacholder, S., Chen, S., Rodriguez, A.C., & Burk, R.D. 2005. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 191:1796-1807.
- Herzog, R.I., Liu, C., Waxman, S.G., & Cummins, T.R. 2003. Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties. *J Neurosci* 23:8261-8270.
- Higgins, D.G. & Sharp, P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates.
- Hines, J.F., Ghim, S.J., & Jenson, A.B. 1996. Human papillomavirus infection. *BMJ* 312:522-523.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Isom, L.L. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7:42-54.
- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., & Catterall, W.A. 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83:433-442.
- Jurkat-Rott, K. & Lehmann-Horn, F. 2001. Human muscle voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Curr Opin Pharmacol* 1:280-287.
- Koo, G.C., Blake, J.T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotna, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Jr., Cunningham, P., Wunderler, D.L., McManus, O.B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N.H., Springer, M.S., & Feeney, W. 1997. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158:5120-5128.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes, J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B., & Abel, P.D. 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 150:1213-1221.
- Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- le Guennec, J.Y., Ouadid-Ahidouch, H., Soriani, O., Besson, P., Ahidouch, A., & Vandier, C. 2007. Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2:189-202.
- Lipkind, G.M. & Fozzard, H.A. 1994. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophys J* 66:1-13.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Mahdavi, A. & Monk, B.J. 2005. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 10:528-538.
- Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., & Isom, L.L. 2002. Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem* 277:26681-26688.

- Mathews M.,S.N.H.J.** 2007. Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McEwen, D.P., Meadows, L.S., Chen, C., Thyagarajan, V., & Isom, L.L.** 2004. Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem* 279:16044-16049.
- McNeill, R.E., Miller, N., & Kerin, M.J.** 2007. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 8:107.
- Meadows, L.S. & Isom, L.L.** 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 67:448-458.
- Mendez, F., Munoz, N., Posso, H., Molano, M., Moreno, V., van den Brule, A.J., Ronderos, M., Meijer, C., & Munoz, A.** 2005. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 192:1158-1165.
- Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Petrou, S., Dibbens, L.M., Berkovic, S.F., & Harkin, L.A.** 2005. SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat* 25:535-542.
- Mycielska, M.E., Fraser, S.P., Szatkowski, M., & Djamgoz, M.B.** 2003. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* 195:461-469.
- Narahashi, T.** 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1-26.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., & Numa, S.** 1986. Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320:188-192.
- Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., & Hsieh, J.T.** 2002. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 167:1836-1843.
- Olsen, M.L., Schade, S., Lyons, S.A., Amaral, M.D., & Sontheimer, H.** 2003. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J Neurosci* 23:5572-5582.
- Onganer, P.U. & Djamgoz, M.B.** 2005. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na⁽⁺⁾ channel expression in vitro. *J Membr Biol* 204:67-75.
- Pardo, L.A.** 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19:285-292.
- Pardo, L.A., Bruggemann, A., Camacho, J., & Stuhmer, W.** 1998. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol* 143:767-775.
- Pardo, L.A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stuhmer, W.** 2005. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 205:115-124.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., & Mazoyer, S.** 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11:2805-2814.
- Pirami, L., Giache, V., & Becciolini, A.** 1997. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 50:600-604.
- Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P.E., Maucort-Boulch, D., & Wheeler, C.M.** 2007. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 195:1582-1589.
- Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.L., Leguennec, J.Y., Bougnoux, P., & Vandier, C.** 2006. Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol Cancer Ther* 5:2946-2953.

- Powell, C.T., Gschwend, J.E., Fair, W.R., Brittis, N.J., Stec, D., & Huryk, R. 1996. Overexpression of protein kinase C-zeta (PKC-zeta) inhibits invasive and metastatic abilities of Dunning R-3327 MAT-LyLu rat prostate cancer cells. *Cancer Res* 56:4137-4141.
- Qin, N., D'Andrea, M.R., Lubin, M.L., Shafae, N., Codd, E.E., & Correa, A.M. 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur J Biochem* 270:4762-4770.
- Quinn, M.A., Benedet, J.L., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Creasman, W.T., Heintz, A.P., Ngan, H.Y., & Pecorelli, S. 2006. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95 Suppl 1:S43-103.
- Ritchie, J.M. & Rogart, R.B. 1977. The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 79:1-50.
- Roden, R. & Wu, T.C. 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6:753-763.
- Rodriguez, C., Calle, E.E., Tatham, L.M., Wingo, P.A., Miracle-McMahill, H.L., Thun, M.J., & Heath, C.W., Jr. 1998. Family history of breast cancer as a predictor for fatal prostate cancer. *Epidemiology* 9:525-529.
- Roger, S., Besson, P., & le Guennec, J.Y. 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616:107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., & le Guennec, J.Y. 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 39:774-786.
- Roy, M.L. & Narahashi, T. 1992. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 12:2104-2111.
- Salais, J.S., Solorza Luna, G.N., Muñoz Gonzalez, D.E., Chanona Vilchis, J.G., López Ovispo, J.L., & Frías Mendivil, M. 2004. Results of the treatment in microinvasive uterine cervical cancer in the National Institute of Cancer in Mexico. *Gamo* 3:106-108.
- Sambrook J. and Russell D. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor.
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., & Wanke, E. 2006. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem* 281:20326-20337.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., & Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- Schmidt, J., Rossie, S., & Catterall, W.A. 1985. A large intracellular pool of inactive Na channel alpha subunits in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4847-4851.
- Schwab, A. 2001. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F739-F747.
- Schwab, A., Wulf, A., Schulz, C., Kessler, W., Nechyporuk-Zloy, V., Romer, M., Reinhardt, J., Weinhold, D., Dieterich, P., Stock, C., & Hebert, S.C. 2006. Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol* 206:86-94.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C., & Nilius, B. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol* 529 Pt 2:385-394.
- Shen, M.R., Wu, S.N., & Chou, C.Y. 1996. Volume-sensitive chloride channels in the primary culture cells of human cervical carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1315:138-144.
- Srinivasan, J., Schachner, M., & Catterall, W.A. 1998. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15753-15757.

- Stanley, M.A., Pett, M.R., & Coleman, N.** 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 35:1456-1460.
- Suzuki, T. & Takimoto, K.** 2004. Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int J Oncol* 25:153-159.
- Taylor, J.T., Huang, L., Pottle, J.E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B.M., Agrawal, K.C., Hansen, J.B., & Li, M.** 2008a. Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 267:116-124.
- Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S., & Li, M.** 2008b. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol* 14:4984-4991.
- Thimmapaya, R., Neelands, T., Niforatos, W., Davis-Taber, R.A., Choi, W., Putman, C.B., Kroeger, P.E., Packer, J., Gopalakrishnan, M., Faltynek, C.R., Surowy, C.S., & Scott, V.E.** 2005. Distribution and functional characterization of human Nav1.3 splice variants. *Eur J Neurosci* 22:1-9.
- Toyota, M., Ho, C., Ohe-Toyota, M., Baylin, S.B., & Issa, J.P.** 1999. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 59:4535-4541.
- Viswanathan, P.C. & Balsev, J.R.** 2004. Inherited sodium channelopathies: a continuum of channel dysfunction. *Trends Cardiovasc Med* 14:28-35.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S., & von Knebel, D.M.** 2004. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64:3878-3884.
- Wonderlin, W.F. & Strobl, J.S.** 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* 154:91-107.
- Woodman, C.B., Collins, S.I., & Young, L.S.** 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22.
- Xiao, Z.C., Ragsdale, D.S., Malhotra, J.D., Mattei, L.N., Braun, P.E., Schachner, M., & Isom, L.L.** 1999. Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem* 274:26511-26517.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., & MacKinnon, R.** 1991. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 251:939-942.
- Yu, F.H. & Catterall, W.A.** 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4:207.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., Scheuer, T., & Curtis, R.** 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23:7577-7585.